

Avaliação do potencial de utilização de microalgas como alimento alternativo na alimentação de animais de produção

Cátia Sofia Carvalho Mota

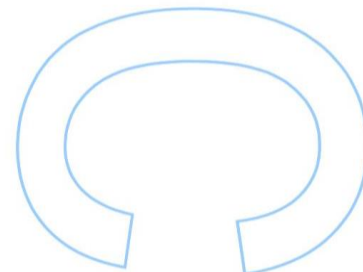
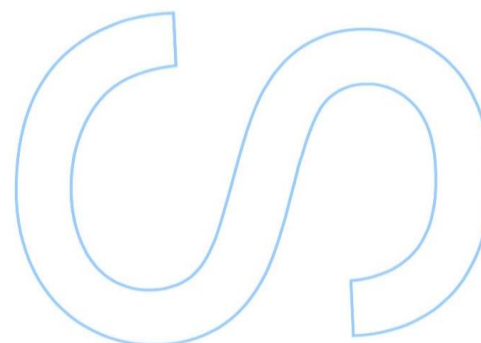
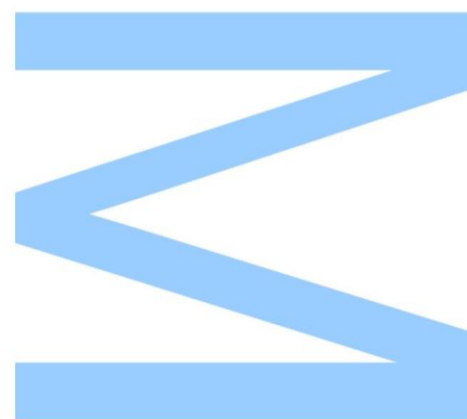
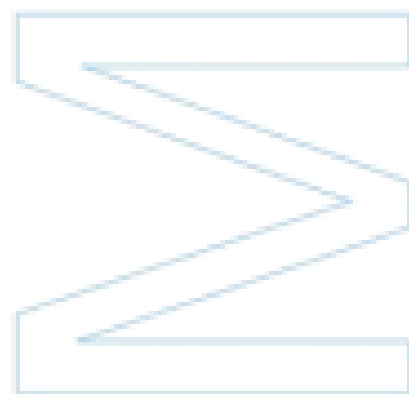
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Mestrado em Engenharia Agronómica

2018

Avaliação do potencial de utilização de microalgas como alimento alternativo na alimentação de animais de produção

Cátia Sofia Carvalho Mota

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Mestrado em Engenharia Agronómica
2018





Avaliação do potencial de utilização de microalgas como alimento alternativo na alimentação de animais de produção

Cátia Sofia Carvalho Mota

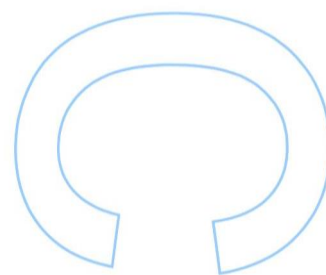
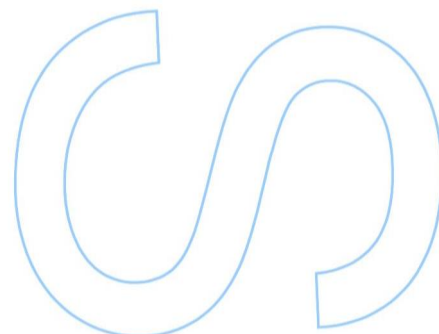
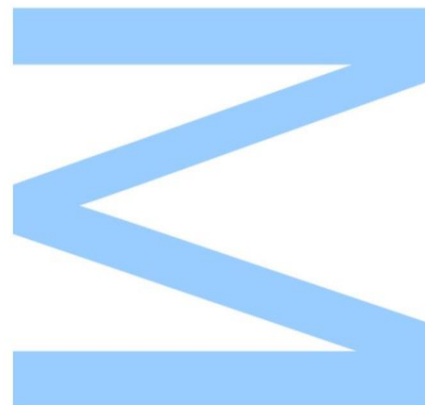
Mestrado em Engenharia Agronómica
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território
2018

Orientador

Margarida Rosa Garcez Maia, Investigadora, REQUIMTE, LAQV,
Professora Auxiliar Convidada, Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar, Universidade do Porto

Coorientadores

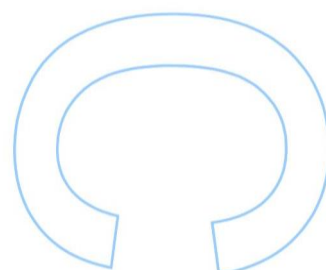
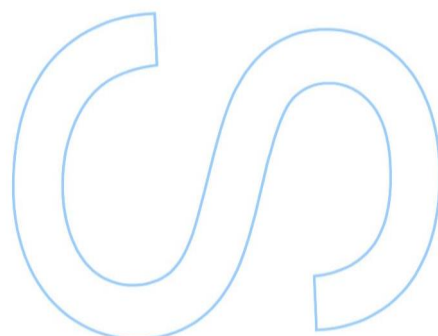
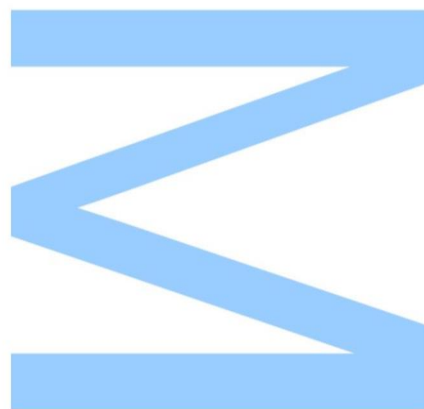
Ana Rita Jordão Bentes Cabrita, Professora Auxiliar, Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto
António José Mira da Fonseca, Professor Associado com Agregação,
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Queria agradecer à minha orientadora Professora Doutora Margarida Maia pela ajuda, paciência, carinho e disponibilidade durante este percurso, que muitas vezes não foi fácil devido aos imensos obstáculos, mas que sempre me ajudou a superar.

À minha coorientadora Professora Doutora Ana Rita Cabrita pela receptividade para me auxiliar sempre que precisasse, pelo carinho e todo o apoio ao longo do trabalho.

Gostaria também de agradecer ao meu coorientador Professor Doutor António Mira da Fonseca pela oportunidade de realizar esta dissertação e o trabalho experimental, no Laboratório de Ciência Animal, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, onde pude aprender e criar novas valências.

À Allmicroalgae - Natural Products S.A. (Lisboa, Portugal) pela cedência das microalgas, sem as quais este trabalho não poderia ser realizado.

À Engenheira Sílvia Azevedo que esteve sempre por perto, ajudando quando alguma dificuldade surgia durante o trabalho experimental, por simpatizar com as minhas brincadeiras e estar sempre disponível para tudo.

Ao Rafael por estar sempre ao meu lado, mesmo quando as coisas não corriam bem, e que sempre me incentivava a continuar. Para além disso, obrigada pela companhia e paciência durante todo o meu percurso.

Aos meus pais e irmão que, mesmo aparecendo dificuldades, não desistiram nem impediram que eu pudesse terminar o meu percurso académico.

Às minhas meninas do laboratório pelas horas do almoço, as conversas e os “breaks” tão preciosos.

Aos meus amigos pelos bons e maus momentos que passamos juntos, pelos conselhos e incentivos.

A todos os mencionados e subentendidos, obrigada por tudo!

Resumo

As microalgas podem constituir fontes alimentares alternativas na dieta de animais monogástricos e ruminantes. Contudo, existe uma elevada variabilidade de espécies de microalgas e do valor nutritivo entre espécies e dentro de cada espécie. O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação do valor nutritivo de cinco lotes de produção de três espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* e *Tetraselmis* sp.) para animais monogástricos e animais ruminantes. Procedeu-se à determinação da composição química (matéria seca, cinza, azoto, proteína bruta, gordura bruta, fibra de detergente neutro e amido) e da digestibilidade *in vitro*. Foi, ainda, avaliado o efeito das microalgas nos parâmetros de fermentação ruminal através da realização de ensaios *batch* em que cada lote de produção foi incubado a um nível de 10% com dois substratos base (palha de trigo e silagem de milho). A composição química das microalgas sugere que estes recursos têm potencial para serem utilizados em alimentação animal. A *C. vulgaris* apresentou maiores teores em proteína bruta e fibra de detergente neutro, a *N. oceanica* apresentou o maior teor em gordura bruta e a *Tetraselmis* sp. apresentou o maior teor em amido. Os valores de digestibilidade obtidos foram elevados, quer para animais monogástricos, quer para animais ruminantes. A *Tetraselmis* sp. apresentou a maior digestibilidade quer em animais monogástricos, quer em animais ruminantes. Em animais monogástricos não houve diferenças entre a *C. vulgaris* e a *N. oceanica*, mas em animais ruminantes, a *C. vulgaris* foi a que apresentou menor digestibilidade. A espécie de microalga afetou significativamente os parâmetros de fermentação ruminal, refletindo as diferenças na composição química e digestibilidade entre as espécies estudadas. Neste ponto, a composição da parede celular sugere ter tido uma grande influência nos resultados obtidos. O lote de produção afetou significativamente o valor nutritivo das microalgas, tornando essencial a sua avaliação por rotina. Esta variação entre lotes confere a possibilidade de manipulação das condições de cultivo das microalgas de forma a valorizar componentes específicos importantes para cada espécie animal, estágio fisiológico e sistema de produção.

Palavras-chave: Composição química, *Chlorella vulgaris*, Digestibilidade, Lote de produção, Monogástricos, *Nannochloropsis oceanica*, Ruminantes, *Tetraselmis* sp., Valor nutritivo.

Abstract

Microalgae can constitute alternative feed ingredients in the diet of monogastric and ruminant animals. However, there is a high variability of microalgae species and of nutritional value among species and within each species. The main objective of this work was to evaluate the nutritional value of five production lots of three microalgae (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Tetraselmis* sp.) for monogastric animals and ruminant animals. The chemical composition (dry matter, ash, nitrogen, crude protein, crude fat, neutral detergent fiber and starch) and *in vitro* digestibility were determined. The effect of microalgae on ruminal fermentation parameters was also evaluated by incubating each production lot at a level of 10% with two base substrates (wheat straw and corn silage) in a batch system. The chemical composition of microalgae suggests that these resources have the potential to be used in animal feed. *C. vulgaris* presented the highest levels of crude protein and of neutral detergent fiber, *N. oceanica* had the highest crude fat content and *Tetraselmis* sp. presented the highest starch content. The obtained digestibility values are considered high for both monogastric and ruminant animals. *Tetraselmis* sp. presented the highest digestibility in both monogastric and ruminant animals. In monogastric animals there were no differences between *C. vulgaris* and *N. oceanica*, but in ruminant animals, *C. vulgaris* presented the lowest digestibility. The microalgae species significantly affected ruminal fermentation parameters, reflecting differences in chemical composition and digestibility among the studied species. The composition of the cell wall can have contributed to these results. The production lot significantly affected the nutritive value of microalgae, making routine evaluation essential. This variation between lots confers the possibility of manipulation of the culture conditions of the microalgae to value specific components important for each animal species, physiological stage and production system.

Key words: Chemical composition, *Chlorella vulgaris*, Digestibility, Monogastrics, *Nannochloropsis oceanica*, Nutritive value, Production lot, Ruminants, *Tetraselmis* sp..

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	x
Índice de figuras	xiii
Índice de quadros	xv
Abreviaturas	xvi
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Microalgas	5
2.2. Composição proximal das microalgas.....	7
2.3. Utilização das microalgas na alimentação animal	10
2.3.1. Inclusão de microalgas na alimentação de animais monogástricos	10
2.3.1.1. Leporídeos.....	10
2.3.1.2. Suínos	10
2.3.1.3. Aves.....	11
2.3.1.3.1. <i>Galinhas poedeiras</i>	11
2.3.1.3.2. <i>Frangos</i>	11
2.3.1.3.3. <i>Patos</i>	12
2.3.1.4. Aquacultura.....	12
2.3.2. Inclusão de microalgas na alimentação de animais ruminantes.....	12
2.3.2.1. Ruminantes em crescimento.....	12
2.3.2.2. Ruminantes em lactação.....	13
2.3.2.2.1. <i>Efeito da suplementação com microalgas na produção de leite</i>	13
2.3.2.2.2. <i>Efeito da suplementação com microalgas na síntese de proteína do leite</i>	14
2.3.2.2.3. <i>Efeito da suplementação com microalgas na síntese de gordura do leite</i>	14

3. Material e métodos	17
3.1. Microalgas	17
3.2. Composição química	18
3.2.1. Matéria seca	19
3.2.2. Cinza	19
3.2.3. Azoto e proteína bruta	20
3.2.4. Gordura bruta	21
3.2.5. Fibra de detergente neutro	23
3.2.6. Amido	24
3.3. Digestibilidade <i>in vitro</i> em monogástricos	25
3.4. Digestibilidade <i>in vitro</i> em ruminantes.....	28
3.4.1. Animais dadores de inóculo ruminal e dietas	29
3.4.2. Incubação.....	30
3.4.3. Parâmetros fermentativos.....	30
3.4.4. Digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica	31
3.5. Análise estatística.....	32
4. Resultados.....	35
4.1. Composição química	35
4.2. Digestibilidade <i>in vitro</i> em animais monogástricos	37
4.3. Digestibilidade <i>in vitro</i> em animais ruminantes	38
5. Discussão	49
5.1. Composição química	49
5.2. Digestibilidade <i>in vitro</i> em animais monogástricos	51
5.3. Digestibilidade <i>in vitro</i> em animais ruminantes	53
6. Conclusão.....	57
7. Referências bibliográficas	59

Índice de figuras

Figura 1. Evolução dos consumos diários <i>per capita</i> (a) e dos consumos anuais (b) de leite e de carne a nível global entre 1980 e 2015 e projeções dos mesmos para 2030 e 2050. Dados adaptados de FAOSTAT (2015), Thornton (2010) e United Nations (2017).	4
Figura 2. Imagem obtida em microscópio de a) <i>Chlorella vulgaris</i> , b) <i>Nannochloropsis oceanica</i> e c) <i>Tetraselmis</i> sp. Adaptado de Barsanti e Gualtieri, 2014.....	17
Figura 3. Cultivo de microalgas em biorreatores tubulares. Fonte: Allmicroalgae - Natural Products S.A. (Lisboa, Portugal).....	17
Figura 4. Palha de trigo (a) e silagem de milho (b), e bagaço de soja (c) usados, respetivamente, como substratos base e alimento controlo nos ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> , após secagem e moenda.	18
Figura 5. Representação esquemática do protocolo experimental do ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i> em animais monogástricos. Adaptado de Boisen e Fernández (1997).	26
Figura 6. Representação esquemática do protocolo experimental do ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i> em animais ruminantes. Adaptado de Tilley e Terry (1963) e modificado por Goering e Van Soest (1970).	28
Figura 7. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) das espécies <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i> e <i>Tetraselmis</i> sp. em animais monogástricos. Barras com notações diferentes (^{a, b, c}) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).	37
Figura 8. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) dos cinco lotes de produção das espécies <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i> e <i>Tetraselmis</i> sp. em animais monogástricos. Barras com notações diferentes (^{a, b, c}) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).	39
Figura 9. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) dos substratos base (palha de trigo e silagem de milho) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes (^{a, b}) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).	40
Figura 10. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) do controlo (substratos base) e da inclusão de 10% (g/100 g matéria	

seca) das espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis* sp.) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes ^(a, b, c) são significativamente diferentes ($P < 0,05$). 42

Figura 11. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) dos lotes (L) de produção (L1, L2, L3, L4, L5) das espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis* sp.) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes ^(a, b, c) são significativamente diferentes ($P < 0,05$). 45

Figura 12. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) da interação entre o substrato base (palha de trigo, PT, e silagem de milho, SM) e as espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis* sp.) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes ^(a, b, c) são significativamente diferentes ($P < 0,05$). 47

Índice de quadros

Quadro 1. Composição proximal (g/100 g MS) de algumas espécies de microalgas. Adaptado de Anele <i>et al.</i> (2016), Christaki <i>et al.</i> (2011), Madeira <i>et al.</i> (2017) e Priyadarshani e Rath (2012).	8
Quadro 2. Padrões para a quantificação da glucose.	25
Quadro 3. Composição em ingredientes (kg/dia) e composição química (g/kg matéria seca, MS) das dietas dos animais dadores de inóculo ruminal.	29
Quadro 4. Composição química (% na matéria seca, MS) das três espécies de microalgas estudadas.	35
Quadro 5. Composição química (% na matéria seca, MS) dos lotes (L) de produção (L1, L2, L3, L4, L5) das três espécies de microalgas estudadas.	36
Quadro 6. Efeito do substrato base (palha de trigo ou silagem de milho) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação <i>in vitro</i> com inóculo ruminal tamponado.	38
Quadro 7. Efeito do controlo (substrato base) e da inclusão de 10% (g/100 g matéria seca) das espécies de microalgas (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i> , e <i>Tetraselmis</i> sp.) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação <i>in vitro</i> com inóculo ruminal tamponado.	41
Quadro 8. Efeito do lote (L) de produção (L1, L2, L3, L4, L5) das espécies de microalgas (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i> , e <i>Tetraselmis</i> sp.) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação <i>in vitro</i> com inóculo ruminal tamponado.	43
Quadro 9. Efeito da interação entre substrato base (palha de trigo e silagem de milho) e espécie de microalgas (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Nannochloropsis oceanica</i> , e <i>Tetraselmis</i> sp.) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação <i>in vitro</i> com inóculo ruminal tamponado.	46

Abreviaturas

AGV – Ácidos gordos voláteis

C2 – Ácido acético

C2:C3 – Rácio ácido acético:ácido propiónico

C3 – Ácido propiónico

C4 – Ácido butírico

C5 – Ácido valérico

C6 – Ácido caproico

C7 – Ácido enântico

DHA - Ácido docosahexaenoico

Dig. MO – Digestibilidade da matéria orgânica

Dig. MS – Digestibilidade da matéria seca

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético sal disódico

EPA – Ácido eicosapentaenoico

EPM – Erro padrão da média

EUA – Estados Unidos da América

FDN – Fibra de detergente neutro

GB – Gordura bruta

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

iC4 – Ácido *iso*-butírico

iC5 – Ácido *iso*-valérico

iC6 – Ácido *iso*-caproico

ICBAS-UP – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

L – Lotes

MO – Matéria orgânica

MS – Matéria seca

N – Azoto

NaOH – Hidróxido de sódio

ND – Não determinado

ORBEA – Organismo Responsável pelo Bem-Estar dos Animais

PB – Proteína bruta

PT – Palha de trigo

SM – Silagem de milho

1. Introdução

O crescente interesse nas microalgas por parte do setor da produção animal, tanto de animais monogástricos, terrestres e aquáticos, como de animais ruminantes, tem por base a necessidade premente do setor se tornar mais produtivo, de modo a fazer face ao crescimento da população mundial e à crescente demanda por produtos de origem animal (FAO, 2017). Crescimento este que se estima continuar a aumentar a um ritmo sem precedentes, particularmente nos países em vias de desenvolvimento, podendo chegar aos 11 mil milhões de pessoas em 2100 (FAO, 2017). O aumento da produtividade do setor animal só será possível se for acompanhado por aumentos de eficiência produtiva e da sustentabilidade, produzindo maior quantidade de animais com maior qualidade, de acordo com os padrões de ética e bem-estar animal, e usando os recursos naturais de forma mais sustentável. Neste sentido, as microalgas, como microrganismos fotossintéticos altamente eficientes a converter luz solar e dióxido carbono atmosférico em biomassa de elevado valor nutritivo (Becker, 2013), surgem como fontes alimentares alternativas e sustentáveis. Importa, assim, avaliar as microalgas existentes no mercado Português de modo a identificar quais as espécies animais que as melhor poderão utilizar nutricionalmente.

Face à diversidade de microalgas, é fundamental conhecer a composição química e nutricional das diferentes espécies para a sua adequada identificação e seleção para fins específicos, como a alimentação de animais monogástricos e ruminantes. No entanto, o perfil da composição química e nutricional das microalgas variam não apenas entre espécies, mas também dentro da mesma espécie. Parte desta variabilidade intraespecífica é atribuída às diferenças nos meios de cultivo. De facto, fatores ambientais, como a temperatura e a salinidade, e a disponibilidade de nutrientes podem afetar de sobre maneira a composição química das microalgas (Hu, 2004), sendo expectável que essas variações sejam refletidas na sua digestibilidade. Esta plasticidade das microalgas para alterarem o seu valor nutritivo face a diferentes condições de cultivo abre a possibilidade da otimização das condições de cultivo no sentido de promover a produção de nutrientes ou compostos bioativos específicos, com particular interesse para a nutrição animal. Por sua vez, esta mesma plasticidade resulta numa complexidade acrescida que dificulta a comparação e identificação das espécies de microalgas e condições de cultivo mais adequadas para serem usadas no sector da produção animal (Bernaerts *et al.*, 2018).

O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação da composição química e digestibilidade *in vitro* em animais monogástricos e ruminantes de cinco lotes de

produção de três espécies de microalgas – *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* e *Tetraselmis* sp. Nesse sentido, numa primeira fase, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a utilização de microalgas na alimentação animal, quer de animais monogástricos, quer de animais ruminantes. De seguida, apresentam-se os resultados obtidos relativamente à composição química e digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica das microalgas selecionadas. No caso particular dos animais ruminantes, foram realizados ensaios *batch* de curta duração para avaliar o efeito das microalgas nos parâmetros de fermentação ruminal, bem como o eventual efeito da interação entre a microalga e o substrato base através da incubação das microalgas com dois substratos (palha de trigo e silagem de milho). Com este trabalho pretende-se gerar conhecimento relativo à utilização das microalgas na alimentação animal com vista à utilização eficiente destes recursos mais sustentáveis.

2. Revisão bibliográfica

Ao longo do último século, a população mundial tem vindo a aumentar a um ritmo sem precedentes, particularmente nas últimas décadas (Alexandratos e Bruinsma, 2012). Em 1930, a população mundial era de dois mil milhões de pessoas. Foram necessários 20 anos para que a população mundial crescesse 25%, aumentando para os 2,5 mil milhões em 1950. Nos 20 anos seguintes, o crescimento mundial foi de 48%, tendo sido atingidos os 3,7 mil milhões de pessoas em 1970. Nos 40 anos seguintes, a população mundial cresceu 86,5%, tendo sido de 6,9 mil milhões de pessoas em 2010 (Alexandratos e Bruinsma, 2012). Apesar da taxa de crescimento demográfico estar a estabilizar nos países desenvolvidos, continua a aumentar a um ritmo elevado, particularmente, nos países em vias de desenvolvimento, prevendo-se que a população mundial atinja os 9,6 mil milhões em 2050 (United Nations, 2017). Para fazer face a este rápido aumento populacional, a produção de alimentos, quer de origem vegetal quer de origem animal, terá de sofrer um acréscimo acentuado, sendo previsto um aumento que ronda os 70% face a 2009 (FAO, 2009).

A crescente pressão exercida pelo crescimento populacional na demanda por alimentos coloca desafios renovados ao sector agropecuário para produzir alimentos em quantidade e qualidade, e com menor impacto ambiental (Thornton, 2010). Dentro deste sector, a pecuária, no seu todo e em termos globais, tem sido dinamizada de modo a dar resposta à procura crescente de produtos alimentares de origem animal. Enquanto nos países em vias de desenvolvimento a pecuária tem evoluído de modo a aumentar a produção, nos países desenvolvidos muitos dos sistemas de produção animal não visam o aumento de produção, mas sim o aumento da eficiência de produção e da sustentabilidade ambiental do sistema (Thornton, 2010). Adicionalmente, fatores associados com o aumento populacional como o aumento da urbanização e do poder económico têm efeitos no padrão de consumo alimentar e, particularmente, de produtos de origem animal. Com a urbanização, diminui a disponibilidade de terras passíveis de serem utilizadas para a produção animal. Contudo, a urbanização estimula o desenvolvimento de infraestruturas, designadamente de cadeias de frio, que permitem a conservação dos produtos de origem animal perecíveis e que estes sejam comercializados mais abrangentemente (Delgado, 2005). À medida que o poder económico da população tem vindo a aumentar, tem-se verificado uma maior procura por produtos de origem animal e aumento das despesas mensais com estes produtos (Steinfeld *et al.*, 2006). Sendo esperada a continuação do crescimento económico, é expectável que o padrão de aumento da procura de alimentos de origem animal se

mantenha no futuro. A evolução do consumo de leite e de carne, entre 1980 e 2015, e projeções dos mesmos consumos, entre 2030 e 2050, são apresentados na Figura 1 (FAOSTAT, 2015; Thornton, 2010; United Nations, 2017).

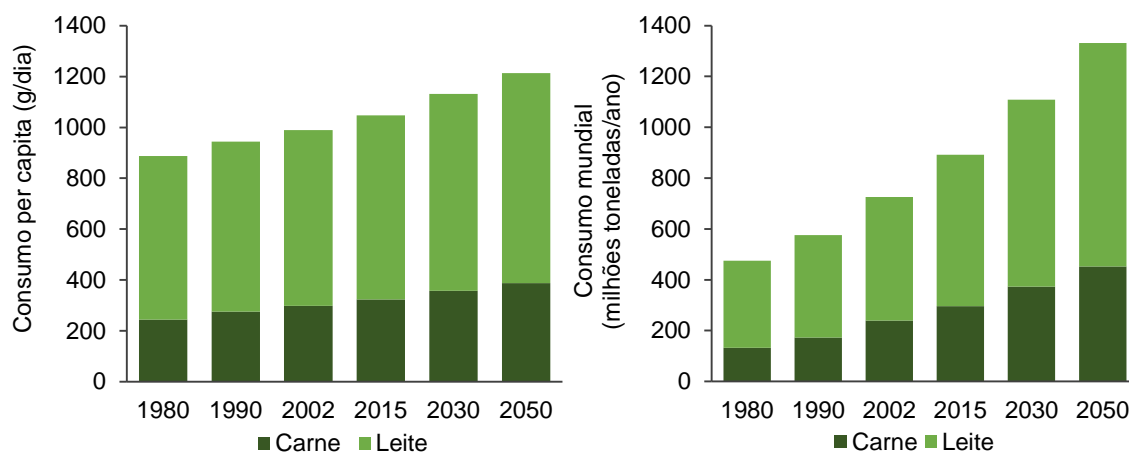


Figura 1. Evolução dos consumos diários *per capita* (a) e dos consumos anuais (b) de leite e de carne a nível mundial entre 1980 e 2015 e projeções dos mesmos para 2030 e 2050. Dados adaptados de FAOSTAT (2015), Thornton (2010) e United Nations (2017).

O principal desafio que se coloca aos sistemas de produção animal é a sua capacidade de resposta à procura de alimentos de origem animal por parte de uma população que se estima chegar aos 9,6 mil milhões em 2050 e, possivelmente, aos 11 mil milhões no final do século (FAO, 2017). Será possível aumentar a resposta produtiva dos sistemas, apesar das pressões devidas à escassa disponibilidade de terra cultivável e recursos hídricos, aos impactos negativos dos sistemas no meio ambiente e à sua contribuição para as alterações climáticas? De momento, a visão consensual da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) é que os sistemas de produção animal atualmente existentes têm a capacidade de produzir alimento suficiente para fazer face à procura. Contudo, o setor da produção animal terá de ter uma abordagem mais holística, sendo necessários sistemas inovadores e avanços tecnológicos que protejam os recursos naturais e a sustentabilidade dos sistemas de produção, ao mesmo tempo que aumentem a sua produtividade (FAO, 2017). Daqui decorre a necessidade crescente de utilização de fontes alimentares alternativas na alimentação animal. Neste sentido, as algas surgem como promissoras alternativas alimentares.

As algas são microrganismos aquáticos e fotossintéticos que apareceram no planeta Terra há cerca de 3,5 mil milhões de anos, sendo, atualmente, encontrados em diversos ecossistemas, existindo mesmo em condições ambientais extremas (Chu,

2012). As algas são distinguidas em organismos multicelulares – as macroalgas – que podem chegar aos 60 metros de comprimento, e em organismos unicelulares – as microalgas ou fitoplâncton – cujo tamanho varia entre 0,2 e 2 μm (Christaki *et al.*, 2011; Chu, 2012; Kovač *et al.*, 2013). Tanto as macroalgas como as microalgas têm sido usadas na alimentação animal e humana desde tempos imemoriais, ainda que numa escala diminuta. Contudo, devido à sua composição em hidratos de carbono estruturais, não digeríveis pelas enzimas digestivas dos animais monogástricos, as macroalgas surgem como um alimento alternativo mais direcionado para a alimentação de animais ruminantes (Maia *et al.*, 2016). Contrariamente, a composição nutricional das microalgas sugere que estas poderão ser um promissor alimento alternativo para a alimentação animal no seu todo, i.e., tanto para animais ruminantes como para animais monogástricos (Wells *et al.*, 2017). Adicionalmente, as microalgas têm a vantagem de usar dióxido de carbono atmosférico e produzirem oxigénio, contribuindo, assim, para reduzir os efeitos dos gases de estufa (Gouveia e Oliveira, 2009) produzidos pelos sistemas de produção animal.

2.1. Microalgas

As microalgas são um grupo complexo de microrganismos, sendo estimado que existam mais de 100.000 espécies de microalgas, ainda que apenas 30.000 espécies sejam conhecidas até à data (Richmond e Hu, 2013), e apenas algumas espécies sejam cultivadas, industrialmente, em quantidade e comercialmente disponíveis (Sousa *et al.*, 2008).

O grupo das microalgas é composto por diatomáceas, algas verdes e algas douradas, todas elas eucariontes, e por cianobactérias, procariontes. A inclusão das cianobactérias nas microalgas é controversa, havendo alguns taxonomistas que as incluem no filo das bactérias (Hasan e Rina, 2009). Utilizando a classificação taxonómica usada por Barsanti e Gualtieri (2014), que inclui as cianobactérias, as microalgas podem pertencer aos filos Cyanobacteria, Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta, Charophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Ochrophyta, Myzozoa (classe Dinophyceae) e Euglenozoa (classe Euglenophyceae).

A complexidade da taxonomia das microalgas reflete-se na diversidade de estruturas celulares básicas, de coloração e de ciclos de vida (Demirbas, 2010). As microalgas podem ser encontradas: (i) desagrupadas, em células individuais com ou sem mobilidade; (ii) agrupadas em colónias variáveis, formadas por organização de várias células, sem número nem formato definido, e formadas por divisão celular; e (iii)

agrupadas em colónias filamentosas, formadas por organização linear de várias células, resultado da divisão celular no plano perpendicular ao eixo do filamento (Barsanti e Gualtieri, 2014; Canter-Lund e Lund, 1995; Graham *et al.*, 2009; Priyadarshani e Rath, 2012).

As microalgas são eficientes “fábricas verdes” capazes de converter a energia solar, dióxido de carbono e compostos orgânicos e/ou inorgânicos em biomassa rica em nutrientes orgânicos (Becker, 2013). Deste modo, as microalgas contribuem para a fixação de carbono. De acordo com a capacidade de utilização da fonte de carbono (orgânica e/ou inorgânica), as microalgas podem ser designadas por autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas (Brennan e Owende, 2010; Graham *et al.*, 2009; Priyadarshani e Rath, 2012). As microalgas que utilizam compostos inorgânicos como fonte de carbono designam-se autotróficas, as que utilizam compostos orgânicos para crescimento designam-se heterotróficas, designando-se por mixotróficas, ou autotróficas facultativas, as microalgas capazes de viver de modo autotrófico ou heterotrófico, dependendo da concentração de compostos orgânicos e de inorgânicos e da intensidade da luz (Brennan e Owende, 2010; Graham *et al.*, 2009; Priyadarshani e Rath, 2012). O habitat destes microrganismos é extremamente variável, encontrando-se espécies de microalgas em ambientes de água doce, de água salgada, de água salobra e até mesmo nos solos (Barsanti e Gualtieri, 2014).

Em contraste com as culturas agrícolas, as microalgas não necessitam de grandes áreas de cultivo, nem de terrenos férteis, podendo ser cultivadas em zonas não adequadas à agricultura, como as orlas costeiras. Algumas espécies de microalgas conseguem rendimentos produtivos muito elevados, podendo mesmo ter produções mais elevadas do que algumas culturas tradicionais (Christaki *et al.*, 2011; Kovač *et al.*, 2013). Como exemplo, enquanto a produção de óleos vegetais, como o óleo de palma e de coco, é em média de 5.960 e 2.689 L/ha/ano, respetivamente, as estimativas laboratoriais de produção de algumas espécies de microalgas variam entre 10.000 e 60.000 L/ha/ano (Chisti, 2007, 2008). Adicionalmente, as microalgas utilizam de forma mais eficiente a energia solar para o crescimento e produção do que as plantas terrestres (Priyadarshani e Rath, 2012).

O potencial fotossintético das microalgas para produção de compostos com valor acrescentado e para produção de energia, conduziu ao interesse crescente na produção de biomassa microalgal para ingrediente ou suplementos alimentares para a alimentação humana e animal, como fonte de compostos bioativos e para produção de biodiesel (Chew *et al.*, 2017). O cultivo de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel expandiu-se rapidamente nas últimas décadas, sendo um

potencial substituto dos combustíveis fósseis (Demirbas, 2007). A produção de biodiesel a partir de microalgas assenta na fração lipídica destes microrganismos (Kovač *et al.*, 2013), podendo o resíduo, parcialmente ou totalmente desengordurado, ser usado na alimentação animal (Drewery *et al.*, 2014; Lum *et al.*, 2013). Contudo, a produção de biodiesel a partir de microalgas nunca foi economicamente competitiva devido aos altos custos associados com a aglutinação, centrifugação, secagem e lise das células para a extração de lípidos (Nascimento *et al.*, 2014). Neste cenário, os estudos de avaliação do uso de microalgas nas indústrias farmacêuticas e de cosmética e na alimentação humana e animal têm vindo a aumentar (Barone *et al.*, 2018).

2.2. Composição proximal das microalgas

As microalgas são, de modo geral, fontes ricas em macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos, como aminoácidos, proteínas, ácidos gordos polinsaturados, lípidos, hidratos de carbono estruturais e não estruturais, minerais, vitaminas, antioxidantes e pigmentos (Batista *et al.*, 2013; Bennamoun *et al.*, 2015; Chu, 2012; Kovač *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014). Contudo, a composição nutricional varia com o género, a espécie, as condições físico-químicas e nutricionais de crescimento, as necessidades metabólicas e o tempo de cultivo (Spolaore *et al.*, 2006).

Entre os fatores físico-químicos, destacam-se (i) a intensidade da luz, que afeta a fotossíntese, as atividades celulares e a produção de polissacarídeos e de ácidos gordos (Hu, 2004; Kumar *et al.*, 2014); (ii) o pH, que afeta determinantemente o crescimento (Kumar *et al.*, 2014); e (iii) a temperatura, que afeta a composição em lípidos, aminoácidos, e carotenoides das microalgas (Converti *et al.*, 2009; Hu, 2004). De forma semelhante, os nutrientes disponíveis podem, também, influenciar o crescimento das microalgas, nomeadamente: (i) o azoto que, quando em quantidades limitantes, afeta a fotossíntese devido à diminuição do teor de clorofilas, ao mesmo tempo que promove a produção de hidratos de carbono e/ou lípidos; (ii) o fósforo (presente nos componentes estruturais e funcionais que são necessários para o crescimento e desenvolvimento das microalgas) que, quando em défice, diminui o teor em clorofila e aumenta o teor de hidratos de carbono; e (iii) o ferro (micronutriente importante na composição bioquímica das células) que pode interferir na fotossíntese, respiração, fixação de azoto e na síntese de ADN (Hu, 2004). Adicionalmente, em algumas espécies de microalgas, como a *Nannochloropsis gadinata*, o aumento do tempo de cultivo promove a acumulação de biomassa, de lípidos, de ácidos gordos polinsaturados e de compostos lipofílicos, como os pigmentos (Hu *et al.*, 2015).

No Quadro 1 apresenta-se a composição proximal de algumas espécies de microalgas. Em geral, as microalgas são compostas (na matéria seca, MS) por: 12 a 71% de proteína (Christaki *et al.*, 2011), 10 a 57% de hidratos de carbono, maioritariamente polissacarídeos, como celulose e amido (Chen *et al.*, 2013), e 6 a 86% de lípidos, particularmente esteróis e ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e ómega-6 (Spolaore *et al.*, 2006).

Quadro 1. Composição proximal (g/100 g MS) de algumas espécies de microalgas. Adaptado de Anele *et al.* (2016), Christaki *et al.* (2011), Madeira *et al.* (2017) e Priyadarshani e Rath (2012).

Microalga	Proteína	Hidratos de carbono totais	Fibra	Lípidos
<i>Arthrospira platensis</i>	60,3-65,8	16,8-22,6	0,50-1,80	1,80-7,30
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62,0	23,0	ND	3,00
<i>Chlorella vulgaris</i>	41,0-58,0	12,0-29,8	0,40-14,4	10,0-34,8
<i>Diacronema vlkianum</i>	57,0	32,0	ND	6,0
<i>Dunaliella bioculata</i>	49,0	4,00	ND	8,00
<i>Dunaliella salina</i>	39,0-61,0	14,0-32,0	ND	14,0-20,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	29,0	14,0	ND	11,0
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48,0	27,0	ND	15,0
<i>Isochrysis</i> sp.	27,0-45,4	13,3-18,0	<18,0	17,2-27,3
<i>Micractinium reisseri</i>	14,6	30,1	10,7	32,3
<i>Nannochloris bacilaris</i>	13,8	27,2	25,9	35,4
<i>Nannochloropsis granulata</i>	35,0	14,9	ND	28,5
<i>Porphyridium</i> sp.	29,7-38,5	26,5-57,0	0,30-0,50	6,10-14,0
<i>Scenedesmus</i> sp.	28,5	36,4	27,7	11,5
<i>Schizochytrium</i> sp.	12,1	32,0	0,60	38,0-71,1
<i>Spyrogira</i> sp.	6,00–20,0	33,0–64,0	ND	11,0–21,0
<i>Spirulina maxima</i>	60,0–71,0	8,00–16,0	ND	4,00–9,00
<i>Tetracystis</i> sp.	13,2	27,7	26,2	36,1

ND – não determinado

O elevado teor em proteína e o facto de serem fonte de aminoácidos essenciais, leva a que diversas espécies de microalgas sejam consideradas fontes

proteicas alternativas para a alimentação animal (Kovač *et al.*, 2013). Tomando o exemplo da *Chlorella*, o teor em proteína (na MS) varia entre 50 a 60% e a qualidade da sua proteína é semelhante à das leveduras, à soja e à proteína do leite (Kovač *et al.*, 2013). Assim, as microalgas emergem como possíveis alternativas ao bagaço de soja, que constitui a fonte proteica mais utilizada na dieta de animais de produção. Alternativas ao bagaço de soja são fundamentais e urgentes, uma vez que a União Europeia está fortemente dependente da importação deste alimento de países terceiros, e a China domina o mercado mundial de importação de soja, consumindo cerca de 41% do total das exportações de soja (Song *et al.*, 2009).

Os hidratos de carbono são, também, nutrientes importantes nas microalgas (Kovač *et al.*, 2013). Tipicamente, os hidratos de carbono das microalgas compreendem uma porção de fibra dietética (i.e., hidratos de carbono estruturais) (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015), o que pode ser benéfico para a flora microbiana do intestino dos animais. Apesar de possuírem teores relativamente elevados de fibra (36 a 95% dos hidratos de carbono totais), as microalgas não possuem lenhina e apresentam baixo teor em hemicelulose (Tibbetts *et al.*, 2015). Estes factos pressupõem que a parede celular das microalgas é altamente digestível e que a proteína será altamente disponível uma vez que não está complexada com lenhina (Moore e Jung, 2001). No entanto, a digestibilidade da fração de hidratos de carbono varia entre espécies, sendo os hidratos de carbono de *Arthrospira* mais eficientemente digestíveis em animais ruminantes do que os de *Chlorella* ou *Scenedesmus obliquus* (Sousa *et al.*, 2008).

As microalgas são ainda fontes importantes de lípidos, particularmente de ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e ómega-6. A ingestão de ácidos gordos polinsaturados ómega-3, particularmente ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), tem sido associada a efeitos benéficos na saúde humana, tais como redução da doença vascular cerebral, arteriosclerose, processos inflamatórios e doenças metabólicas como a obesidade e o cancro (Calder, 2006; Colomer *et al.*, 2007; Larsson *et al.*, 2004). Muitas espécies de microalgas marinhas são ricas nestes ácidos gordos com propriedades nutracêuticas (Adarme-Vega *et al.*, 2012), sendo o DHA principalmente produzido por espécies heterotróficas, como *Schizochytrium limacinum*, e o EPA principalmente produzido por espécies autotróficas, como *Phaeodactylum tricornutum* e *Nannochloropsis* sp. (Adarme-Vega *et al.*, 2012).

As microalgas são, também, fontes de minerais, designadamente de sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, manganês, cobre e iodo (Christaki *et al.*, 2011; Priyadarshani e Rath, 2012) e de vitaminas, como retinol, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, ácido ascórbico e tocoferol (Christaki

et al., 2011; de Jesus Raposo e de Moraes, 2015; Priyadarshani e Rath, 2012). Adicionalmente, as microalgas são fontes importantes de pigmentos como clorofila e de carotenoides, os últimos com importante efeito antioxidante (Christaki *et al.*, 2011).

2.3. Utilização das microalgas na alimentação animal

Cerca de 30% da produção mundial de microalgas é utilizada no sector dos alimentos compostos para animais, principalmente devido ao alto teor e qualidade da proteína (Becker, 2007; Christaki *et al.*, 2011). Na União Europeia, as únicas espécies de microalgas atualmente registadas como alimento ou ingrediente alimentar para dietas de animais (EU regulation 767/2009) são a *Spirulina maxima* e *S. platensis*, género *Schizochytrium* (Altomonte *et al.*, 2018), sendo maioritariamente usadas em aquacultura. Diversos estudos têm sido efetuados para avaliar a inclusão de microalgas, como suplemento alimentar ou como ingrediente, nas dietas de animais monogástricos e de animais ruminantes.

2.3.1. Inclusão de microalgas na alimentação de animais monogástricos

2.3.1.1. Leporídeos

A incorporação de *S. platensis* em dietas para hipercolesterolemias reduziu os níveis sanguíneos de colesterol e aumentou as lipoproteínas de elevada densidade em coelhos adultos (Colla *et al.*, 2008). O desmame de láparos com 9 a 13 semanas de idade cuja dieta continha *S. platensis* não mostrou qualquer efeito negativo no desempenho produtivo (Peiretti e Meineri, 2008), enquanto em coelhos adultos aumentou a digestibilidade da proteína bruta (Peiretti e Meineri, 2009).

O consumo de microalgas ricas em ácidos gordos polinsaturados foi demonstrado aumentar o teor destes ácidos gordos na carne dos coelhos (Mordenti *et al.*, 2010; Tassinari *et al.*, 2001).

2.3.1.2. Suínos

O consumo de 2% de *S. platensis* por leitões desmamados melhorou ligeiramente o ganho de peso vivo (Grinstead *et al.*, 2000). Já a ingestão de uma microalga rica em DHA por suínos na fase de engorda (peso vivo de ca. 100 kg) não afetou o peso vivo de abate nem o rendimento em carcaça (Marriott *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Sardi *et al.* (2006) após administração de *Schizochytrium* sp. a suínos

com 160 kg de peso vivo. Adicionalmente, foi observado um enriquecimento da carne de porco e da gordura subcutânea com DHA com a suplementação com microalgas (Marriott *et al.*, 2002; Sardi *et al.*, 2006).

A inclusão de 0,1% de *Chlorella vulgaris* melhorou o desempenho produtivo de porcos na fase de engorda e a digestibilidade e diminuiu as emissões de gases com efeito de estufa (Yan *et al.*, 2012).

2.3.1.3. Aves

2.3.1.3.1. *Galinhas poedeiras*

Dietas com 2 e 10% de *Chlorella* aumentaram o teor em ácido linoleico e DHA na gema do ovo, especialmente com a dieta com 10% de alga (Grigorova *et al.*, 2006). A inclusão de *C. vulgaris* na dieta a níveis de 0,25, 0,50 e 0,75% foram suficientes para promover a postura, aumentar o número e a qualidade de ovos postos e o desempenho da eclosão (Halle *et al.*, 2009). A adição de *Spirulina* melhorou a cor da gema do ovo (Carrillo *et al.*, 2008).

2.3.1.3.2. *Frangos*

A substituição de bagaço de soja por *Chlorella* aumentou o desempenho produtivo de frangos quando a um nível de 10%, mas diminuiu o crescimento quando a um nível de 20%, especialmente na fase de recria (Yoshida e Hoshii, 1982). Microalgas verdes, como a *Chlorella*, podem, ainda, constituir uma fonte de pigmentos para frangos (Lipstein e Talpaz, 1984), com níveis de inclusão de *C. vulgaris* de 1% na dieta a promover o estado imunológico de frangos e, conseqüentemente, o seu ganho de peso vivo (Kang *et al.*, 2013). Frangos alimentados com dietas suplementadas com 7,4% de DHA Gold (produto comercial obtido a partir de *Schizochytrium* sp.) tiveram maior crescimento e rendimento de carcaça e carne com perfil em ácidos gordos mais benéfico (Ribeiro *et al.*, 2014). No entanto, estes autores observaram menor aceitação da carne suplementada por parte dos consumidores e menor estabilidade oxidativa da mesma, concluindo que o nível de suplementação usado (7,4%) foi demasiado elevado (Ribeiro *et al.*, 2014).

2.3.1.3.3. *Patos*

Dietas suplementadas com 0,1 e 0,2% de *C. vulgaris* fermentada promoveram o crescimento, a resistência da tíbia e a qualidade da carne de patos de Pequim após seis semanas de suplementação (Oh *et al.*, 2015).

2.3.1.4. Aquacultura

As microalgas têm sido estudadas como ingredientes alimentares em aquacultura dado muitas espécies possuírem mais de 50% de proteína, com um perfil em aminoácidos comparável ao da farinha de peixe, e apresentarem teores elevados em ácidos gordos polinsaturados (Barone *et al.*, 2018). Adicionalmente, a suplementação com microalgas ricas em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 visa melhorar a qualidade do filete, via deposição destes ácidos gordos, e substituir a farinha de peixe e o óleo de peixe incluídos nas dietas (Sarker *et al.*, 2016a; Sarker *et al.*, 2016b; Tibaldi *et al.*, 2015).

Vários estudos sobre o uso de *Chlorella* sp. na alimentação de peixes têm mostrado o seu potencial como imunoestimulante (Grammes *et al.*, 2013; Zahran e Risha, 2014), fonte de pigmentos (Gouveia *et al.*, 2003), fonte de provitamina A (Gouveia *et al.*, 2002), estimulante do desempenho produtivo (Xu *et al.*, 2014) e fonte proteica (Mahboob *et al.*, 2012). Por sua vez, espécies de microalgas ricas em carotenoides são fontes de pigmentos para carpa, salmão, camarão, entre outras espécies (Sousa *et al.*, 2008).

2.3.2. Inclusão de microalgas na alimentação de animais ruminantes

2.3.2.1. Ruminantes em crescimento

A inclusão de 4% de *Isochrysis* sp. não afetou a *performance*, a composição de carcaça nem as características nutricionais da carne de borregos, com exceção do aumento do perfil de ácidos gordos insaturados e da diminuição do poder antioxidante (de la Fuente-Vazquez *et al.*, 2014). Borregos alimentados com 2% de DHA Gold aumentaram os depósitos de gordura e a composição em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 no tecido muscular, ainda que a composição nutricional não tenha sido afetada (Díaz *et al.*, 2017).

2.3.2.2. Ruminantes em lactação

A suplementação das dietas com microalgas tem como objetivos: i) substituir parcialmente a fonte energética, milho ou alimento concentrado (Boeckaert *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2016), ou adicionadas à suplementação lipídica (Stamey *et al.*, 2012; Toral *et al.*, 2010); ii) constituir uma fonte de proteína, em substituição parcial da soja (Póti *et al.*, 2015; Reynolds *et al.*, 2006) ou da colza (Lamminen *et al.*, 2017)); e iii) melhorar o sistema de imunitário e o *status* oxidativo dos produtos (Tsiplakou *et al.*, 2018) dado o seu teor natural em compostos antioxidantes.

Todavia, a suplementação com microalgas, em geral, diminui a ingestão de MS. Este efeito pode ser devido a baixa palatabilidade das microalgas em ovelhas e vacas (Franklin *et al.*, 1999; Lamminen *et al.*, 2017; Papadopoulos *et al.*, 2002), provavelmente devido ao sabor, ao cheiro e à estrutura física do alimento (especialmente se a microalga é seca e finamente moída). A palatabilidade pode ser melhorada granulando a dieta (Lamminen *et al.*, 2017). Outro fator que poderá reduzir a ingestão voluntária é a diminuição da digestibilidade da fibra, parcialmente relacionada com os hidratos de carbono fermentáveis da microalga, e ao reduzido tamanho de partícula, que têm uma influência negativa no pH do rúmen (Stokes *et al.*, 2015). A diminuição da ingestão pode ainda ser devida a alterações na fermentação ruminal devido aos ácidos gordos polinsaturados das microalgas que podem ter efeito tóxico na microflora ruminal (Boeckaert *et al.*, 2008).

2.3.2.2.1. Efeito da suplementação com microalgas na produção de leite

Não é fácil comparar os estudos devido a diferenças na quantidade de microalga utilizada, na duração do estudo e na composição da dieta. Alguns estudos não encontraram efeitos na produção de leite, quer em grandes quer em pequenos ruminantes, não tendo sido também observados efeitos em estudos em que a ingestão de MS foi reduzida (Franklin *et al.*, 1999; Lamminen *et al.*, 2017; Moate *et al.*, 2013; Papadopoulos *et al.*, 2002; Tsiplakou *et al.*, 2018; Tsiplakou *et al.*, 2017).

Apesar da redução da ingestão de MS, o facto de a suplementação com microalgas não afetar a produção de leite, sugere aumento da eficiência alimentar (Franklin *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2002), provavelmente resultante da incorporação direta dos ácidos gordos das microalgas na gordura do leite (Goulas, 2000). Contudo, alguns estudos referem diminuição na produção de leite (Boeckaert *et al.*, 2008; Kulpys *et al.*, 2009).

2.3.2.2.2. *Efeito da suplementação com microalgas na síntese de proteína do leite*

Os resultados são contraditórios, dependendo das espécies, da dieta, do nível de ingestão e do nível de produção de leite. Alguns autores referem ausência de efeitos na proteína do leite em vacas, ovelhas e cabras (Bichi *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2016; Moate *et al.*, 2013; Tsiplakou *et al.*, 2018; Tsiplakou *et al.*, 2017).

Pelo contrário, outros estudos referem diminuição da produção de proteína do leite em vacas, maioritariamente seguida de uma diminuição da ingestão voluntária e da produção de leite (Boeckaert *et al.*, 2008), enquanto outros referem uma tendência para a diminuição da proteína do leite, embora não relacionada com menor ingestão ou produção de leite (Lamminen *et al.*, 2017). Alguns autores sugeriram que a diminuição da proteína do leite pode ser devida ao baixo teor de histidina das microalgas, o que limita a produção de leite (Lamminen *et al.*, 2017).

2.3.2.2.3. *Efeito da suplementação com microalgas na síntese de gordura do leite*

Alguns estudos referem redução da produção de gordura do leite de vacas (Boeckaert *et al.*, 2008; Moate *et al.*, 2013) entre um mínimo de 22% a um máximo de 59% (Boeckaert *et al.*, 2008; Franklin *et al.*, 1999). Contudo, outros estudos referem ausência de efeitos na gordura do leite (da Silva *et al.*, 2016; Lamminen *et al.*, 2017; Stamey *et al.*, 2012; Tsiplakou *et al.*, 2018; Tsiplakou *et al.*, 2017).

De um modo geral, independentemente da espécie animal, a inclusão de microalgas na alimentação animal teve efeitos benéficos no crescimento, na performance produtiva, e no perfil em ácidos gordos, especialmente relacionadas com os ácidos gordos polinsaturados ómega-3, em particular o DHA e o EPA, do leite e da carne. Contudo, a excessiva suplementação com algas pode afetar negativamente a palatabilidade, a ingestão voluntária e o metabolismo ruminal, podendo ainda ter efeitos negativos na produção de leite e de gordura.

2.4. Objetivos

O presente trabalho teve como principal objetivo gerar conhecimento relativo à utilização das microalgas na alimentação animal com vista à utilização eficiente destes recursos mais sustentáveis. De modo a atingir este objetivo geral, procedeu-se à determinação do valor nutritivo de três espécies de microalgas (*C. vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* e *Tetraselmis* sp.) de modo a inferir o seu potencial como alimento alternativo tanto para animais monogástricos como para animais ruminantes. O efeito do lote de produção das espécies de microalgas selecionadas no seu valor nutritivo foi também avaliado.

3. Material e métodos

O trabalho experimental que agora se apresenta foi desenvolvido no Laboratório de Ciência Animal, do Departamento de Clínicas Veterinárias, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS-UP), entre setembro de 2017 e outubro de 2018.

3.1. Microalgas

No ensaio foram avaliados cinco lotes de três espécies de microalgas (*C. vulgaris*, *N. oceanica* e *Tetraselmis* sp.) (Figura 2).

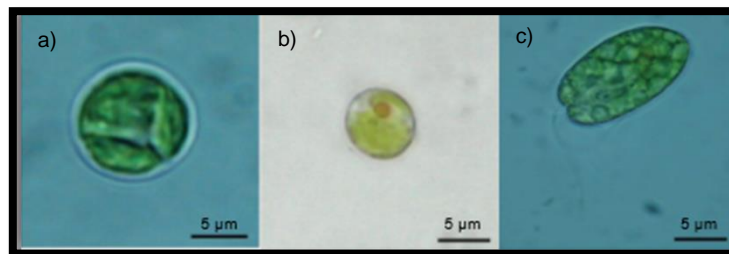


Figura 2. Imagem obtida em microscópio de a) *Chlorella vulgaris*, b) *Nannochloropsis oceanica* e c) *Tetraselmis* sp. Adaptado de Barsanti e Gualtieri, 2014.

Os diferentes lotes de cada microalga foram produzidos ao longo do ano e/ou em diferentes anos, não tendo sido disponibilizados detalhes relativos às condições de cultivo nem à época de produção, excetuando terem sido cultivadas em reatores tubulares ao ar livre (Figura 3).



Figura 3. Cultivo de microalgas em biorreatores tubulares. Fonte: Allmicroalgae - Natural Products S.A. (Lisboa, Portugal).

Todos os lotes de microalgas foram gentilmente cedidos pela Allmicroalgae - Natural Products S.A. (Lisboa, Portugal) sob a forma de amostra seca por *spray* e acondicionados em embalagem protetora de humidade, oxigénio e luz. As microalgas foram armazenadas à temperatura ambiente em exsiccador, protegidas da luz.

A palha de trigo (Figura 4a) e a silagem de milho (Figura 4b), usadas como substrato base na determinação da digestibilidade por animais ruminantes e como ingredientes nas dietas dos animais dadores de inóculo de rúmen, e o alimento concentrado, usado na alimentação dos animais dadores, foram secos em estufa com circulação de ar (Memmert UF750, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Alemanha) a 65 °C até peso constante. A palha de trigo e o alimento concentrado foram secos durante 24 h e a silagem de milho durante 48 h. As amostras secas foram moídas em moinho de martelos (Retsch, Haan, Alemanha) com crivo de 1 mm e armazenadas à temperatura ambiente em contentores herméticos e abrigados da luz.

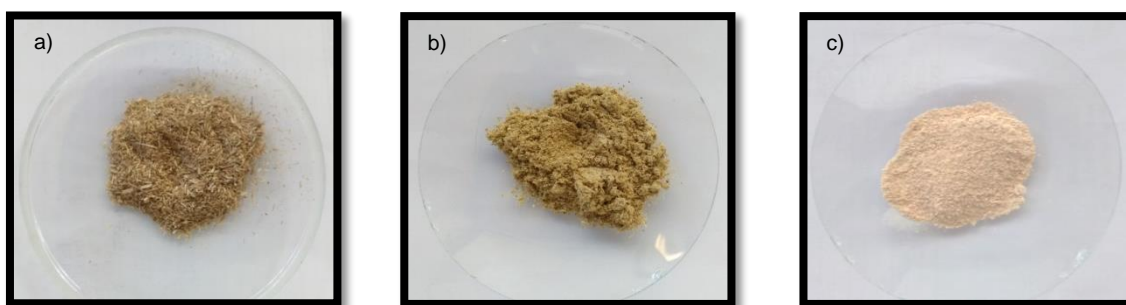


Figura 4. Palha de trigo (a) e silagem de milho (b), e bagaço de soja (c) usados, respetivamente, como substratos base e alimento controlo nos ensaios de digestibilidade *in vitro*, após secagem e moenda.

O bagaço de soja (Figura 4c) foi utilizado como alimento controlo nos ensaios de digestibilidade *in vitro*, após secagem em estufa com circulação de ar a 65 °C durante 24 h e moídas em moinho de martelos com crivo de 0,5 mm (Tecator Cyclotec 1093, Foss, Hilleroed, Dinamarca). O bagaço de soja moído foi armazenado em contentores herméticos e à temperatura ambiente até o seu uso.

3.2. Composição química

Todos os parâmetros da composição química das diferentes espécies e lotes de produção de microalgas e dos ingredientes vegetais terrestres foram determinados em duplicado (réplicas analíticas).

3.2.1. Matéria seca

O teor em matéria seca (MS) foi determinado gravimetricamente como o resíduo remanescente após secagem, em estufa com circulação de ar a 103 °C (AOAC, 2000, método 930.15). Resumidamente, pesaram-se $2,5 \pm 0,2$ g de amostra para cápsulas de porcelana previamente lavadas, incineradas e taradas, sendo a toma anotada com precisão à décima de miligrama. As cápsulas com as amostras foram colocadas em estufa com circulação de ar (Mettler GmbH + Co. KG), a 103 ± 2 °C, até peso constante. O peso constante foi obtido após 24 h de secagem para as amostras de microalgas e após 15 h de secagem para as amostras de palha de trigo, silagem de milho e alimento concentrado. Após a secagem, as cápsulas com as amostras secas foram colocadas no exsiccador, onde arrefeceram até à temperatura ambiente, e foram pesadas, sendo o peso anotado com precisão à décima de miligrama.

O teor em MS (%) foi calculado como:

$$MS (\%) = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

onde,

- P1 - Peso da cápsula com amostra após secagem (g);
- P2 - Peso da cápsula tarada (g);
- P3 - Peso da amostra (g).

3.2.2. Cinza

A determinação do teor em cinza foi feita sequencialmente à do teor em MS (AOAC, 2000, método 942.05). Assim, após a pesagem, as cápsulas com a amostra seca foram colocadas em mufla (Vulcan 3-550, Ney Vulcan, Bloomfield, Connecticut, Estados Unidos da América, EUA) a 500 ± 20 °C, até peso constante. O peso constante foi obtido após 39 h de incineração para as amostras de microalgas e após 15 h de incineração para as amostras de palha de trigo, silagem de milho e alimento concentrado. As cápsulas com as amostras incineradas foram colocadas no exsiccador até à temperatura ambiente e, em seguida, pesadas em balança analítica de precisão.

O teor em cinza (em % de MS) foi calculado como:

$$Cinza (\% MS) = \frac{P1 - P2}{P3 \times \frac{MS(\%)}{100}} \times 100$$

onde,

- P1 - Peso da cápsula com amostra após incineração (g);
- P2 - Peso da cápsula tarada (g);
- P3 - Peso da amostra (g).

3.2.3. Azoto e proteína bruta

Para a determinação do teor em azoto (N) pesaram-se $0,2 \pm 0,1$ g de amostra para tubo de digestão de 100 mL, aos quais se adicionou uma pastilha de catalisador Kjeldahl à base de cobre (Kjeldahl catalyst 0,3% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Panreac Quimica SLU, Barcelona, Espanha) e 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 96-98% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) (AOAC, 2000, método 984.13). Paralelamente, foram preparados brancos, em que apenas se adicionou catalisador e H_2SO_4 aos tubos. Após agitação no vortex (Vortex Genic 2, Scientific Industries, Bohemia, Nova Iorque, EUA), os tubos foram colocados na unidade de digestão Kjeldahl (Tecator 1009 Digester, Foss) e acoplados à unidade scrubber (modelo 2501, Foss), para extração dos vapores de digestão. Após a digestão a 420 ± 20 °C durante 1 h, os tubos foram retirados da unidade de digestão e deixados arrefecer à temperatura ambiente. O sulfato de amónio formado durante a mineralização ácida foi, de seguida, destilado na unidade de destilação Kjeldahl (Vapodest 40, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Alemanha) na presença de 25 mL de solução a 40% (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH; VWR International, LLC, Radnor, Pensilvânia, EUA) e de 40 mL de água destilada. O amoníaco destilado foi recolhido em Erlenmeyer com 30 mL de solução de ácido bórico [por L: 40 g de ácido bórico (CHEM-LAB NV, Zedelgem, Bélgica), 10 mL de solução a 0,1% de verde de bromocresol (Himedia, Mumbai, Índia), e 7 mL de solução a 0,1% de vermelho de metilo (Merck, Darmstadt, Alemanha)] e titulada com uma solução padronizada de H_2SO_4 a 0,1 N, até ao ponto de viragem (pH 4,6), sendo registado o volume utilizado da solução de H_2SO_4 padronizada.

O teor em N (em % de MS) foi calculado como:

$$N (\% MS) = \frac{[(Va - Vb) \times N(H_2SO_4) \times 1 \times 14,007]}{P \times 10 \times \frac{MS (\%)}{100}}$$

onde,

- Va - Volume de solução padronizada de H₂SO₄ necessário para titular a amostra (mL);
- Vb - Volume de solução padronizada de H₂SO₄ necessário para titular os brancos (mL);
- N(H₂SO₄) - Normalidade da solução padrão de H₂SO₄ usada na titulação (0,1 N);
- 1 - Fator do ácido;
- 14,007 - Peso molecular do N;
- 10 - Conversão de mg/g para g/100 g;
- P - Peso da amostra (g).

O teor em proteína bruta (PB, em % de MS) foi calculado como:

$$PB (\% MS) = N (\% MS) \times F$$

onde,

- F - Fator internacional de conversão, sendo de:
- 6,25 para forragens e alimentos concentrados;
- 4,78 para microalgas (Lourenço *et al.*, 2004).

3.2.4. Gordura bruta

O teor em gordura bruta (GB) foi determinado gravimetricamente como o resíduo remanescente após extração da amostra com éter de petróleo, com ou sem hidrólise prévia (AOAC, 2000, método 920.39). A extração da gordura sem hidrólise aplica-se a amostras de origem vegetal, com algumas exceções, enquanto a extração da gordura com hidrólise se aplica a todas as amostras de origem animal, a algumas amostras de origem vegetal e a alimentos compostos (AOAC, 2000, método 930.39). Assim, a

gordura da palha de trigo, silagem de milho e bagaço de soja foi extraída sem hidrólise e a das microalgas e do alimento concentrado com hidrólise.

Resumidamente, $5,0 \pm 0,2$ g de palha de trigo, silagem de milho ou bagaço de soja foram pesados para cartuchos de extração e cobertos com algodão hidrófilo isento de gordura, que foram colocados em copos de extração, previamente tarados, com 140 mL de éter de petróleo 40-60 °C (CHEM-LAB NV). Em seguida, os copos de extração foram colocados na unidade de extração Soxtherm (C. Gerhardt GmbH & Co. KG) onde a gordura foi extraída num programa de extração a quente (150 °C), com recirculação de solvente, durante 90 min, seguida da evaporação do solvente. Finda a extração, os copos com o resíduo de gordura foram secos em estufa com circulação de ar a 103 °C, durante 12 horas. Após arrefecerem em exsiccador até à temperatura ambiente, os copos de extração com o resíduo de gordura seco foram pesados. Para as microalgas e alimento concentrado, pesaram-se $2,5 \pm 0,2$ g de amostra para gobelés de 600 mL, aos quais se adicionaram 100 mL de solução de ácido clorídrico (HCl; CHEM-LAB NV) a 3M e se levaram à fervura, durante 1 h, em placa de aquecimento com sistema de condensação. Após a fervura, a amostra hidrolisada foi filtrada por papel de filtro Whatman #1 (Whatman plc., Maidstone, Reino Unido), e o resíduo lavado e seco em estufa com circulação de ar a 50 °C durante a noite. O papel de filtro com o resíduo seco foi colocado num cartucho de extração, coberto com algodão isento de gordura e colocado em copo de extração com 140 mL de éter de petróleo 40-60 °C. A extração da gordura, secagem e pesagem do extrato de gordura seco foram realizadas como descrito acima.

O teor em GB (em % de MS) foi calculado como:

$$GB (\% MS) = \frac{(P3 - P2)}{P1 \times \frac{MS (\%)}{100}} \times 100$$

onde,

- P1 - Peso da amostra (g);
- P2 - Peso do copo de extração (g);
- P3 - Peso do copo com a gordura após secagem (g).

3.2.5. Fibra de detergente neutro

O teor em fibra de detergente neutro (FDN) foi determinado gravimetricamente após digestão, a quente, com solução de detergente neutro e α -amílase termoestável, para dissolução de proteínas, lípidos, açúcares, amido e pectinas facilmente digeríveis. O resíduo insolúvel assim obtido é composto, principalmente, por constituintes das paredes celulares vegetais (celulose, hemicelulose e lenhina) (Robertson e Van Soest, 1981; Van Soest *et al.*, 1991).

Para as amostras de palha de trigo, silagem de milho, alimento concentrado e bagaço de soja, pesaram-se $0,5 \pm 0,05$ g para cadinhos de vidro com placa filtrante de porosidade 2, sendo, em seguida, colocados na unidade de digestão Dosi-fiber (J.P. Selecta sa, Barcelona, Espanha). Adicionaram-se 50 mL de solução de detergente neutro [por L: 18,61 g de ácido etilenodiaminotetracético sal disódico (EDTA; Panreac Quimica SLU), 4,56 g de hidrogenofosfato disódico (Merck), 6,81 g de tetraborato de sódio deca-hidratado (Merck), 30 g de lauril sulfato de sódio (Merck), e 10 mL de etilenoglicol (Merck)] e 50 μ L de α -amílase termoestável (A3306, Sigma-Aldrich Inc) e levou-se à fervura durante 60 min. Em seguida, os cadinhos foram filtrados na mesma unidade, lavados, por três vezes, com 30 mL de água fervente e, por duas vezes, com acetona (CHEM-LAB NV). Para as amostras de microalgas, pesaram-se $1,0 \pm 0,1$ g de amostra para gobelés de 600 mL, aos quais se adicionou 100 mL da solução de detergente neutro e 100 μ L de α -amilase termoestável. Após 60 min de fervura em placa de aquecimento com sistema de condensação, a mistura foi filtrada por filtros de membrana de vidro (Whatman GF/A, 1,6 μ m de porosidade, Whatman plc.), e o resíduo foi lavado, por três vezes, com 30 mL de água fervente e, por duas vezes, com acetona. Os cadinhos e filtros foram colocados em estufa com circulação de ar a 103 ± 2 °C durante 24 h e pesados após arrefecimento até à temperatura ambiente em exsiccador. Os cadinhos e filtros com o resíduo fibroso seco foram incinerados em mufla, a 500 ± 2 °C, durante 48 h, sendo depois pesados, após arrefecimento em exsiccador.

O teor em FDN isento de cinza (em % de MS) foi calculado como:

$$FDN \text{ isento de cinza (\% MS)} = \frac{(P2 - P3)}{P1 \times \frac{MS (\%)}{100}}$$

onde,

- P1 - Peso da amostra (g);

- P2 - Peso do cadinho mais resíduo após secagem (g);
- P3 - Peso do cadinho mais resíduo após incineração (g).

3.2.6. Amido

O teor em amido foi determinado espectrofotometricamente como glucose libertada após remoção dos açúcares solúveis da amostra com etanol a 85% e gelatinização e degradação enzimática do amido pelas enzimas α -amilase e amiloglucosidase. A glucose libertada foi doseada usando o método da glucose-oxidase, sendo a intensidade da coloração, medida a 505 nm, proporcional à quantidade de amido presente na amostra (Salomonsson *et al.*, 1984).

De forma resumida, pesaram-se 100 mg de amostra moída a 0,5 mm para um tubo de centrífuga de 50 mL, ao qual se adicionou 25 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1 M, a pH 4,5 [por L: 13,6 g de acetato de sódio tri-hidratado (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, Missouri, EUA), e 5,8 mL ácido acético $\geq 99,7\%$ (Sigma-Aldrich Inc)] e 100 μ L de α -amilase termoestável (A3306, Sigma-Aldrich Inc). Os tubos foram incubados em banho-maria fervente (GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Alemanha) durante 30 min. Após arrefecerem, adicionaram-se 100 μ L de solução a 10% (v/v) de amiloglucosidase (A9913, Sigma-Aldrich Inc) e os tubos foram colocados em banho-maria a 60 °C (GFL 1083), com agitação, durante 16 h. Em paralelo, foram incubados tubos com as mesmas amostras nas mesmas condições, mas sem a adição de enzimas (amostras em branco). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm, a 4 °C durante 10 min, e 2 mL do sobrenadante foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL, sendo o volume perfeito com água. Para preparar a solução padrão de D-glucose, pesaram-se 100 mg de D-glucose (Merck) para um balão volumétrico de 500 mL e perfez-se o volume com água. Para uma placa de 96 poços (~340 μ L de volume, Thermo Fisher Scientific) pipetaram-se os volumes de solução padrão de D-glucose e de água, em triplicado, para construir uma curva de calibração com massas de glucose entre 0 e 10 μ g por poço (Quadro 2).

Em seguida, pipetaram-se 50 μ L de cada amostra, em triplicado, para a placa de 96 poços, e adicionaram-se 150 μ L da solução do kit de determinação da D-Glucose GOPOD (Megazyme, Wicklow, Irlanda) a todos os poços com padrões e amostras. A placa foi colocada no leitor de placas (Synergy HT reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EUA) a 37 °C, e a absorvância foi lida a 505 nm (Gen 5 software, Bio-Tek Instruments), após 60 min de incubação.

Quadro 2. Padrões para a quantificação da glucose.

Massa de glucose (µg)	Solução padrão de D-glucose (µL)	Água (µL)
0,00	0	50
2,00	10	40
4,00	20	30
6,00	30	20
8,00	40	10
10,0	50	0

A concentração de glucose (mg/L) foi calculada como:

$$Glucose (mg/L) = Declive \times absorvância - ordenada na origem$$

Sendo o teor em amido (em % de MS) calculado como:

$$Amido (\% MS) = \frac{Glucose \times VT \times FD \times 0,9}{P \times 10 \times \frac{MS (\%)}{100}}$$

onde,

- Glucose - Concentração de glucose (mg/L);
- VT - Volume de tampão acetato de sódio (mL);
- FD - Fator de diluição;
- 0,9 - Fator de conversão da glucose livre da solução em amido;
- P - Peso da amostra (g);
- 10 - Fator de conversão de g/kg em %.

3.3. Digestibilidade *in vitro* em monogástricos

A digestibilidade *in vitro* das microalgas em animais monogástricos foi estimada pelo método proposto por Boisen e Fernández (1997). Este método consiste numa incubação enzimática em três passos, em que é simulada: (1) a digestão no estômago com pepsina; (2) a digestão intestinal com pancreatina; e (3) a digestão no cólon com um complexo multienzimático com atividades celulolítica, hemicelulolítica, xilanolítica, arabinolítica e β-glucanolítica (Figura 5).

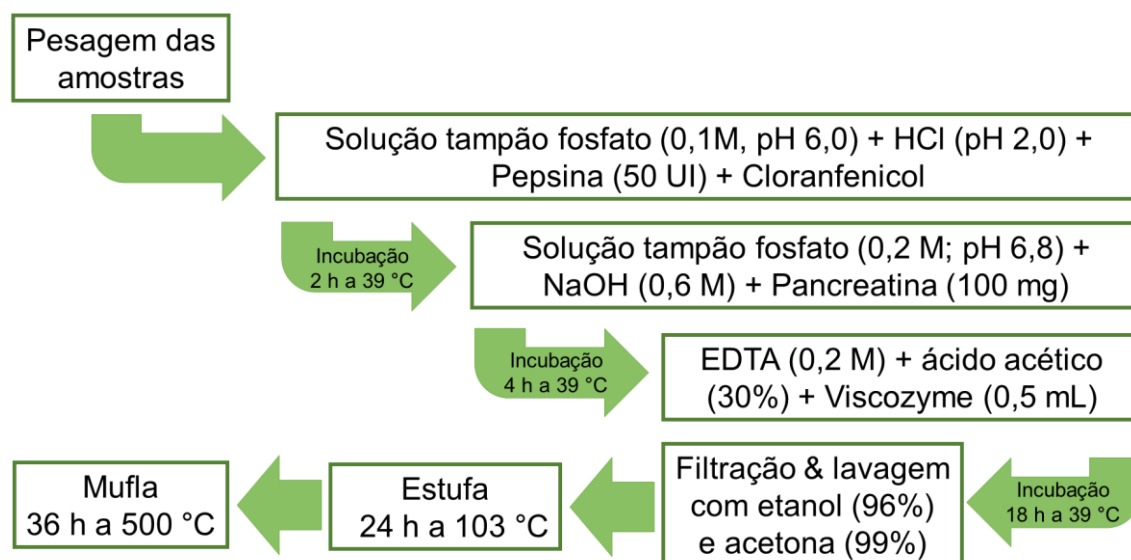


Figura 5. Representação esquemática do protocolo experimental do ensaio de digestibilidade *in vitro* em animais monogástricos. Adaptado de Boisen e Fernández (1997).

Resumidamente, pesaram-se $500 \pm 0,1$ mg de microalga para frascos de vidro de 100 mL, aos quais se adicionaram 25 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, a pH 6,0 [por L: 1,71 g de hidrogenofosfato disódico (Panreac Quimica SLU) e 12,1 g de di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado; Merck] e 10 mL de solução HCl 0,2 M. O pH final da mistura foi ajustado a 2,0, com solução de HCl 1 M ou solução de NaOH 1 M. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de pepsina ácida [100 mg pepsina de suíno (10000 FIP-U/g, VWR International LLC) / 20 mL HCl 0,2 M], e 0,5 mL de solução a 0,5% (m/v) de cloranfenicol em etanol absoluto (cloranfenicol, Sigma-Aldrich Inc; etanol absoluto, VWR International, LLC). Os frascos foram rolhados e incubados em banho-maria, a 39 °C durante 2 h, sob agitação orbital.

Após a incubação com pepsina, adicionaram-se 10 mL de solução tampão fosfato 0,2 M, a pH 6,8 (por L: 13,1g de hidrogenofosfato disódico e 14,8 g de di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado) e 5 mL de solução de NaOH 0,6 M. Após acertar o pH da mistura a 6,8, com solução de HCl 1 M ou de NaOH 1 M, adicionou-se 1 mL de solução de pancreatina [2000 mg pancreatina de suíno (grade IV, P-1750, Sigma-Aldrich Inc)/ 20 mL solução tampão fosfato 0,2 M, pH 6,8]. Os frascos foram, novamente, rolhados e incubados em banho-maria, a 39 °C durante 4 h, sob agitação orbital.

Finda a incubação com pancreatina, adicionaram-se 10 mL de solução de EDTA 0,2 M. O pH foi ajustado a 4,8, com solução de ácido acético a 30% (v/v), e adicionaram-

se 0,5 mL do complexo multienzimático Viscozyme L® (Sigma-Aldrich Inc). Os frascos foram rolhados e incubados em banho-maria, a 39 °C durante 18 h, sob agitação orbital.

Decorrida a terceira incubação, a mistura foi filtrada por cadinhos de vidro com placa filtrante, em sistema de filtração por vácuo. Devido às dimensões das microalgas, a porosidade dos cadinhos usada foi a P4 (porosidade 10-16 µm) em vez da sugerida por Boisen e Fernández (1997) de P2 (40-100 µm). Adicionalmente, utilizou-se, como adjuvante de filtração, um enchimento de celite super fina (Standard Super Cel fine, Sigma-Aldrich Inc) entre papéis de filtro de baixa porosidade e isentos de cinza (Whatman 595, porosidade 4-7 µm). Após filtração, o resíduo foi lavado, por duas vezes, durante 3 min, com 10 mL de etanol a 96% (AGA, Prior Velho, Portugal) e 10 mL de acetona a 99,5% (Panreac Quimica SLU). De seguida, os resíduos foram secos em estufa com circulação de ar a 103 °C, durante 24 h, arrefecidos em exsiccador até à temperatura ambiente e pesados para determinar a digestibilidade da matéria seca (Dig. MS). Os resíduos secos foram, então, incinerados em mufla a 500 °C, durante 36 h, e pesados, após arrefecimento em exsiccador, para determinar a digestibilidade da matéria orgânica (Dig. MO).

A determinação da digestibilidade *in vitro* de cada alga foi feita em triplicado, em diferentes séries. Em cada série foram incubadas amostras em branco (sem microalga) e bagaço de soja (amostra controlo entre séries).

A Dig. MS (%) foi calculada como:

$$Dig. MS(\%) = \frac{\frac{P1 \times MS(\%)}{100} - (P3 - P2 - P4)}{\frac{P1 \times MS(\%)}{100}} \times 100$$

onde,

- P1 – Peso da amostra (g);
- P2 – Peso do cadinho (g);
- P3 – Peso do cadinho com o resíduo seco (g);
- P4 – Peso do resíduo seco da amostra em branco (g).

A Dig. MO (em % MS) foi calculada como:

$$Dig. MO (\% MS) = \frac{(P1 \times \frac{MS(\%)}{100} \times \frac{MO (\% MS)}{100}) - (P3 - P5 - P6)}{P1 \times (\frac{MS (\%)}{100} \times \frac{MO (\% MS)}{100})} \times 100$$

onde,

- P5 – Peso do cadinho com o resíduo incinerado (g);
- P6 – Peso do resíduo seco isento de cinza (i.e., resíduo seco – resíduo incinerado) da amostra em branco (g).

3.4. Digestibilidade *in vitro* em ruminantes

A digestibilidade *in vitro* de dois substratos (silagem de milho e palha de trigo) suplementados com 10% de cada lote de produção e espécie de microalgas em animais ruminantes foi estimada pelo método de duas etapas proposto por Tilley e Terry (1963) e modificado por Goering e Van Soest (1970). Numa primeira fase, a fermentação ruminal é simulada através da incubação com inóculo ruminal tamponado, durante 48 h, e medidos os parâmetros fermentativos (produção total de gás e de metano, pH e produção e perfil de ácidos gordos voláteis, AGV). Em seguida, é simulada a digestibilidade da totalidade do trato digestivo pela hidrólise, a quente, com solução de detergente neutro (Figura 6).

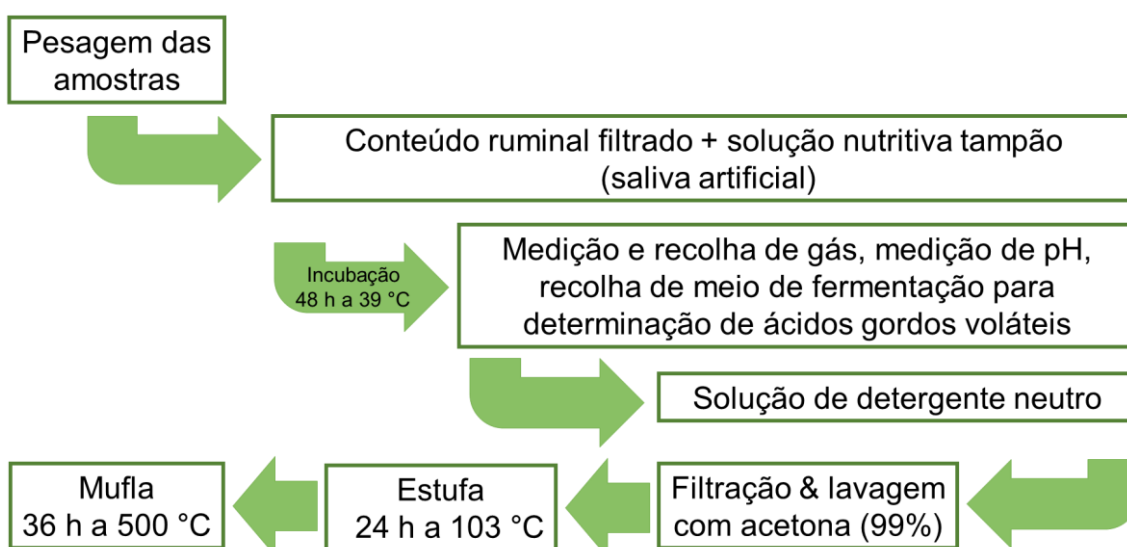


Figura 6. Representação esquemática do protocolo experimental do ensaio de digestibilidade *in vitro* em animais ruminantes. Adaptado de Tilley e Terry (1963) e modificado por Goering e Van Soest (1970).

3.4.1. Animais dadores de inóculo ruminal e dietas

O inóculo ruminal foi obtido de duas vacas Holstein Friesian adultas, não gestantes e não lactantes, fistuladas no rúmen com uma cânula (10 cm diâmetro; Bar Diamond Inc., Parma, Idaho, EUA), que se encontravam alojadas no Centro Clínico e de Investigação Veterinária de Vairão do ICBAS-UP. Os animais foram tratados de acordo com os códigos de boas práticas animais definidos pelas autoridades nacionais e pela diretiva 2010/63/EU da União Europeia. Todos os procedimentos animais e protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Organismo Responsável pelo Bem-Estar dos Animais (ORBEA) do ICBAS-UP e licenciados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária, do Ministério da Agricultura e do Mar (licença #FT2014DGV 046412 ICB).

Cada vaca foi alimentada com uma dieta completa, à base de silagem de milho ou à base de palha de trigo (Quadro 3). As dietas foram distribuídas em duas refeições, em quantidades iguais, fornecidas às 9:30 e 17:30 h. Os animais dadores foram adaptados às dietas durante 30 dias (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2016). No final do período de adaptação, foi recolhido conteúdo ruminal, dos quatro quadrantes do rúmen de cada vaca, antes da refeição da manhã. O conteúdo ruminal foi colocado num termos pré-aquecido a 39 °C e transportado para o laboratório no intervalo máximo de 60 min, de modo a garantir a viabilidade da micropopulação ruminal.

Quadro 3. Composição em ingredientes (kg/dia) e composição química (g/kg matéria seca, MS) das dietas dos animais dadores de inóculo ruminal.

	Vaca 1	Vaca 2
Composição em ingredientes (kg/dia)		
Silagem de milho	10,0	-
Palha de trigo	4,00	8,00
Alimento concentrado	2,00	2,50
Composição química da dieta (g/kg MS)		
Cinza	56,3	77,7
Proteína bruta	25,5	21,4
Gordura bruta	79,8	79,4
Fibra de detergente neutro	564	775
Amido	177	47,4

3.4.2. Incubação

Uma vez no laboratório, o conteúdo ruminal de cada vaca foi filtrado por quatro camadas de gaze e o licor de rúmen filtrado foi misturado, na proporção de 1:2, com solução tampão de Mould [por L: 0,850 g de hidrogenofosfato disódico (Panreac Quimica SLU), 1,31 g de di-hidrogenofosfato de potássio (Panreac Quimica SLU), 5,42 g de bicarbonato de sódio (Thermo Fisher Scientific), 1,41 g de bicarbonato de amónia (VWR International, LLC) e 0,10 g de cloreto de magnésio hexa-hidratado (Sigma-Aldrich Inc)] (Mould *et al.*, 2005), sob fluxo de dióxido de carbono. Em seguida, 50 mL da solução de inóculo ruminal tamponado foram adicionados, sob fluxo de dióxido de carbono, a frascos de soro de 125 mL (Sigma-Aldrich Inc), com $250 \pm 0,1$ mg de substrato base (silagem de milho ou palha de trigo) suplementados com 10% (i.e., $25 \pm 0,1$ mg) de cada microalga. Paralelamente, foram inoculados frascos com igual quantidade de substrato base mas sem suplementação de microalgas (amostras controlo) e frascos sem substrato base nem microalgas (amostras em branco). De modo a certificarmos que as incubações se realizaram de igual modo foram incubados frascos com a mesma quantidade de substrato suplementado com 10% de bagaço de soja, sendo que este último foi usado como controlo entre as incubações. Todos os frascos inoculados foram selados com septos de borracha butílica (Thermo Fisher Scientific), capsulados com cápsulas de alumínio e incubados em banho-maria, a 39 °C durante 48 h, sob agitação orbital.

3.4.3. Parâmetros fermentativos

Após as 48 h de incubação, os frascos foram imediatamente colocados num banho de gelo, durante pelo menos 20 min, para parar a fermentação. Após aquecimento gradual, em banho-maria a 25 °C, a produção total de gás foi medida com um transdutor de pressão (Bailey & Mackey Ltd., Birmingham, Reino Unido), de acordo com o proposto por Theodorou *et al.* (1994). O gás de fermentação produzido foi recolhido com uma seringa estanque ao ar (SGE international PTY Ltd, Ringwood, Victoria, Austrália) e a composição em metano determinada por cromatografia gasosa. Foi usado um cromatógrafo gasoso com detetor de condutividade térmica (GC-4000A, East & West Analytical Instruments, Inc, Pequim, China), equipado com uma coluna de micro-enchimento (Shincarbon ST 100/120, Restek Corporation, Bellefonte, Pensilvânia, EUA). As temperaturas foram de 120 °C no injetor, 160 °C no detetor, 160 °C na ponte e 60 °C no forno. O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 23 mL/min. O metano foi identificado por comparação dos tempos de retenção de uma mistura padrão

(60% dióxido de carbono, 25% azoto, 10% metano e 5% hidrogénio; Air Liquide, Lda., Algés, Portugal) e quantificado como descrito por López e Newbold (2007).

Após a medição e recolha do gás de fermentação, o pH foi imediatamente medido e recolheu-se 1 mL do meio de fermentação para determinação dos AGV. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de solução de detergente neutro e conservaram-se os frascos a -20 °C até determinação da digestibilidade. Para a determinação dos AGV, adicionaram-se 0,25 mL de solução a 25% de ácido o-fosfórico (Sigma-Aldrich Inc) com 16 mM de ácido 3-metil valérico (padrão interno; Sigma-Aldrich Inc) ao 1 mL de meio de fermentação e centrifugou-se a mistura a $19,800 \times g$, a 4 °C durante 15 min. O sobrenadante foi transferido para um vial (VWR International, LLC) e conservado a -20 °C até análise cromatográfica. Os AGV foram analisados em cromatógrafo gasoso com detetor de ionização de chama (Shimadzu GC-2010 Plus, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) equipado com uma coluna capilar (HP-FFAP, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). A temperatura do injetor e do detetor foi de 260 °C. A temperatura do forno foi mantida 1 min a 80 °C, aumentada a 20 °C/min até aos 120 °C, aumentada a 6 °C/min até aos 205 °C, e novamente aumentada a 20 °C/min até aos 240°C. O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 0,86 mL/min. O volume injetado foi de 1 μ L e foi usado um split de 100:1. Os AGV foram identificados por comparação do tempo de retenção do padrão (Volatile Free Acid Mix, Sigma-Aldrich Inc) e quantificados com base no padrão interno.

3.4.4. Digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica

A Dig. MS e a Dig. MO do meio de fermentação foram determinadas após fervura com solução de detergente neutro, modificação proposta por Goering e Van Soest (1970) ao método de Tilley e Terry (1963). Resumidamente, ao meio fermentado foram adicionados 50 mL de solução de detergente neutro e 0,5 mL de 1-octanol (Sigma-Aldrich Inc), e a mistura foi fervida, em placa de aquecimento com sistema de condensação, durante 60 min. De seguida, a mistura hidrolisada foi filtrada por cadinhos de vidro com placa filtrante, em sistema de filtração por vácuo. Devido às dimensões das microalgas, a porosidade dos cadinhos usada foi a P4 (porosidade 10-16 μ m) em vez da sugerida por Goering e Van Soest (1970) de P2 (40-100 μ m). Adicionalmente, utilizou-se, como adjuvante de filtração, um enchimento de celite super fina entre papéis de filtro de baixa porosidade e isentos de cinza (Whatman 595, porosidade 4-7 μ m). Após filtração, o resíduo foi lavado, por três vezes, com 30 mL de água fervente, e com 10 mL de acetona a 99,5%. De seguida, os resíduos foram secos em estufa com

circulação de ar a 103 °C, durante 24 h, arrefecidos em exsiccador até à temperatura ambiente e pesados para determinar a Dig. MS. Os resíduos secos foram, então, incinerados em mufla a 500 °C, durante 36 h, e pesados, após arrefecimento em exsiccador, para determinar a Dig. MO.

A Dig. MS (%) foi calculada como:

$$Dig. MS (\%) = \frac{\frac{P1 \times MS (\%)}{100} - (P3 - P2 - P4)}{\frac{P1 \times MS (\%)}{100}} \times 100$$

onde,

- P1 – Peso da amostra (g);
- P2 – Peso do cadinho (g);
- P3 – Peso do cadinho com o resíduo seco (g);
- P4 – Peso do resíduo seco da amostra em branco (g).

A Dig. MO (em % de MS) foi calculada como:

$$Dig. MO (\% MS) = \frac{(P1 \times \frac{MS(\%)}{100} \times \frac{MO (\% MS)}{100}) - (P3 - P5 - P6)}{P1 \times (\frac{MS (\%)}{100} \times \frac{MO (\% MS)}{100})} \times 100$$

onde,

- P5 – Peso do cadinho com o resíduo incinerado (g);
- P6 – Peso do resíduo seco isento de cinza (i.e., resíduo seco – resíduo incinerado) da amostra em branco (g).

3.5. Análise estatística

Os dados da composição química e da digestibilidade *in vitro* em animais monogástricos foram analisados utilizando o modelo GLM do software SAS (2002; versão 9.1, SAS Institute Inc., Carry, Carolina do Norte, EUA). O modelo incluiu os efeitos fixos da espécie de microalga e do lote de produção dentro da espécie de microalga e o erro residual.

Os dados da digestibilidade *in vitro* em animais ruminantes foram analisados usando o modelo MIXED do SAS, que incluiu os efeitos fixos da espécie de microalga, do lote de produção dentro da espécie de microalga, do substrato base e da interação entre o substrato base e a espécie de microalga e entre o substrato base e o lote de produção dentro da espécie de microalga, o efeito aleatório do inóculo e o erro residual aleatório. Adicionalmente, o teste T, do SAS, foi usado para comparar o efeito da suplementação de microalgas com os substratos base não suplementados (controlo).

Todas as médias dos mínimos quadrados foram ajustadas ao teste Tukey-Kramer (SAS). Os efeitos foram considerados significativos quando $P < 0,05$ e uma tendência quando $0,05 \leq P \leq 0,10$. Quando as interações não foram significativas nem foi observada uma tendência ($P > 0,10$) foram retiradas do modelo.

4. Resultados

4.1. Composição química

A composição química das três espécies de microalgas encontra-se apresentada no Quadro 4. A composição química diferiu significativamente entre espécies de microalgas. Uma vez que as amostras de microalgas foram previamente secas pela empresa fornecedora, o teor em MS foi sempre elevado, tendo o valor superior sido observado na *N. oceanica* e o inferior na *C. vulgaris*. O teor em cinza (na MS) variou entre os 12,3% na *C. vulgaris* e os 28,3% na *N. oceanica*. Já os teores em PB e em FDN foram significativamente superiores na *C. vulgaris* (45,2% e 49,0%, na MS) e inferiores na *Tetraselmis* sp. (21,2% e 16,2%, na MS). A *N. oceanica* apresentou um teor em GB (12,8%, na MS) significativamente superior ao das outras duas espécies estudadas. O teor em amido (% na MS) foi bastante superior na *Tetraselmis* sp. (13,9%, na MS) e praticamente nulo na *N. oceanica* (Quadro 4).

Quadro 4. Composição química (% na matéria seca, MS) das três espécies de microalgas estudadas.

	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.	EPM	P
MS, %	93,6 ^a	96,8 ^c	95,8 ^b	0,03	<0,001
Cinza	12,3 ^a	28,3 ^c	27,8 ^b	0,03	<0,001
N	9,45 ^c	6,00 ^b	4,43 ^a	0,005	<0,001
PB	45,2 ^c	28,7 ^b	21,2 ^a	0,02	<0,001
GB	7,68 ^b	12,8 ^c	6,35 ^a	0,036	<0,001
FDN	49,0 ^c	29,8 ^b	16,2 ^a	0,51	<0,001
Amido	4,34 ^b	0,938 ^a	13,9 ^c	0,0602	<0,001

^{a,b,c} – Na mesma linha, médias com notações diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

N - azoto; PB - proteína bruta; GB - gordura bruta; FDN - fibra de detergente neutro; EPM – erro padrão da média.

O lote de produção dentro da espécie de microalga estudada afetou significativamente todos os parâmetros químicos analisados (Quadro 5). Os teores mais elevados em MS foram observados nos lotes de produção 4 e 5 da *N. oceanica* (97,6% e 97,8%), nos lotes 1 e 5 da *Tetraselmis* sp. (96,4% e 96,6%) e no lote 5 da *C. vulgaris* (95,4%). Relativamente ao teor em cinza, os lotes 4 da *C. vulgaris* e *N. oceanica* e o lote 3 da *Tetraselmis* sp. foram os que apresentaram valores mais elevados (respetivamente, 15,3%, 36,9% e 34,5%, na MS). Já no que se refere ao teor em PB, o

Quadro 5. Composição química (% na matéria seca, MS) dos lotes (L) de produção (L1, L2, L3, L4, L5) das três espécies de microalgas estudadas.

	<i>Chlorella vulgaris</i>					<i>Nannochloropsis oceanica</i>					<i>Tetraselmis</i> sp.					EPM	P
	L1	L2	L3	L4	L5	L1	L2	L3	L4	L5	L1	L2	L3	L4	L5		
MS, %	95,2 ^e	93,9 ^c	92,4 ^b	91,2 ^a	95,4 ^f	96,1 ^h	95,7 ^g	96,7 ^j	97,6 ^k	97,8 ^k	96,4 ⁱ	95,6 ^{fg}	94,8 ^d	95,6 ^{fg}	96,6 ^{ij}	0,07	<0,001
Cinza	11,1 ^a	12,4 ^c	11,1 ^a	15,3 ^d	11,4 ^b	30,2 ^j	22,9 ^f	28,1 ⁱ	36,9 ^l	23,5 ^g	25,9 ^h	25,7 ^h	34,5 ^k	30,3 ^j	22,3 ^e	0,03	<0,001
N	9,57 ^l	9,81 ^m	10,1 ⁿ	8,25 ^k	9,54 ^l	5,83 ^g	6,60 ⁱ	6,02 ^h	5,23 ^f	6,31 ⁱ	4,48 ^c	4,58 ^d	4,08 ^a	4,31 ^b	4,68 ^e	0,011	<0,001
PB	45,8 ^l	46,9 ^m	48,2 ⁿ	39,4 ^k	45,6 ^l	27,9 ^g	31,6 ^j	28,8 ^h	25,0 ^f	30,2 ⁱ	21,4 ^c	21,9 ^d	19,5 ^a	20,6 ^b	22,4 ^e	0,05	<0,001
GB	7,70 ^f	5,51 ^b	7,12 ^e	6,96 ^{de}	11,1 ^h	10,7 ^g	12,4 ^j	12,0 ⁱ	16,0 ^l	12,9 ^k	7,52 ^f	4,96 ^a	6,16 ^c	6,37 ^c	6,73 ^d	0,082	<0,001
FDN	55,5 ^g	54,1 ^g	43,8 ^f	46,8 ^f	45,0 ^f	25,9 ^c	37,6 ^e	31,4 ^d	25,8 ^c	28,2 ^{cd}	7,60 ^a	26,3 ^c	16,1 ^b	16,1 ^b	14,6 ^b	1,15	<0,001
Amido	2,46 ^b	3,88 ^d	3,79 ^{cd}	8,14 ^e	3,41 ^c	0,85 ^a	0,94 ^a	0,91 ^a	1,04 ^a	0,96 ^a	15,4 ⁱ	12,5 ^g	11,1 ^f	13,5 ^h	17,0 ^j	0,135	<0,001

^{a,b,c} – Na mesma linha, médias com notações diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

N - Azoto; PB - proteína bruta; GB - gordura bruta; FDN - fibra de detergente neutro; EPM - erro padrão da média.

lote 4 foi o que apresentou o menor teor e o lote 3 o que apresentou o teor superior, dentro dos lotes de *C. vulgaris* (39,4% e 48,2%, na MS); nos lotes de *N. oceanica*, o lote 4 deteve os valores inferiores e o lote 2 os valores superiores (25,0% e 31,6%, na MS); e, por fim, o lote 3 apresentou os valores mais baixos e o lote 5 os valores mais elevados, dentro dos lotes de *Tetraselmis* sp (19,5% e 22,4%, na MS). O teor em GB foi superior no lote 5 de *C. vulgaris* (11,1%, na MS), no lote 1 de *Tetraselmis* sp. (7,52%, na MS) e no lote 4 de *N. oceanica* (16,0%, na MS). Relativamente ao teor em FDN, para a *C. vulgaris*, os lotes 1 e 2 apresentaram os teores mais elevados de FDN (55,5% e 54,1%, na MS) enquanto para a *N. oceanica* e a *Tetraselmis* sp. foi o lote 2 (respetivamente 37,6% e 26,3%, na MS). O teor em amido foi superior nos lotes de produção 4 e 5, respetivamente de *C. vulgaris* e de *Tetraselmis* sp. (8,14% e 17,0%, na MS). Já para a *N. oceanica*, os lotes de produção apresentaram teores em amido similares, mas significativamente inferiores aos de todos os lotes de produção das outras duas espécies de microalgas estudadas.

4.2. Digestibilidade *in vitro* em animais monogástricos

A Dig. MS estimada *in vitro* para animais monogástricos foi significativamente superior para a *Tetraselmis* sp. (91,9%), não tendo sido observadas diferenças significativas entre a *C. vulgaris* (68,6%) e a *N. oceanica* (71,1%) (Figura 7). A *N. oceanica* apresentou a menor Dig. MO (62,1%, na MS), seguida pela *C. vulgaris* (71,7%, na MS), tendo a *Tetraselmis* sp. apresentado a maior Dig. MO (89,1%, na MS) (Figura 7).

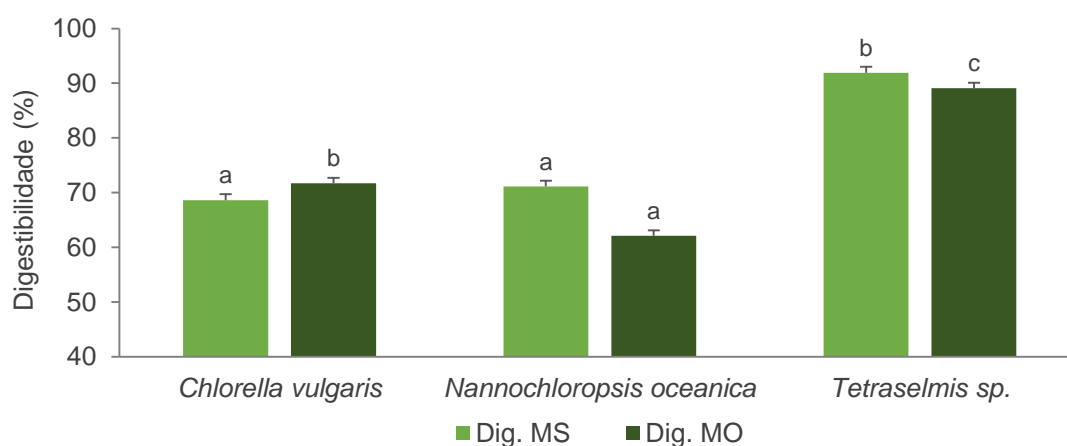


Figura 7. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) das espécies *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* e *Tetraselmis* sp. em animais monogástricos. Barras com notações diferentes (a, b, c) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O lote de produção dentro da espécie de microalga teve um efeito significativo na Dig. MS e Dig. MO em animais monogástricos (Figura 8). A Dig. MS foi significativamente inferior no lote 3 da *C. vulgaris* (58,3%) e no lote 5 da *N. oceanica* (60,4%), tendo o valor mais elevado sido observado no lote 5 da *Tetraselmis* sp. (96,4%), que não diferiu significativamente da Dig. MS dos lotes 1, 2 e 4 da mesma alga (respetivamente, 90,7%, 92,1% e 92,7%). A Dig. MO foi significativamente inferior no lote 5 da *N. oceanica* (50,0% na MS) e superior no lote 5 da *Tetraselmis* sp. (99,0% na MS) (Figura 8).

4.3. Digestibilidade *in vitro* em animais ruminantes

O substrato base utilizado nas incubações teve um efeito significativo em todos os parâmetros de fermentação, com exceção da proporção dos ácidos propiónico e *iso*-caproico (Quadro 6).

Quadro 6. Efeito do substrato base (palha de trigo ou silagem de milho) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação *in vitro* com inóculo ruminal tamponado.

	Palha de trigo	Silagem de milho	EPM	P
Gás (mL/g MS)	167 ^a	262 ^b	39,6	<0,001
Metano (mL/g MS)	15,7 ^a	29,6 ^b	8,11	<0,001
pH	6,45 ^b	6,31 ^a	0,020	<0,001
Total AGV (mM/g MS)	10,0 ^a	10,4 ^b	0,85	<0,001
C2 (mM/100 mM)	69,2 ^b	64,8 ^a	2,77	<0,001
C3 (mM/100 mM)	17,5	17,8	0,88	0,091
iC4 (mM/100 mM)	1,17 ^a	1,23 ^b	0,140	<0,001
C4 (mM/100 mM)	8,71 ^a	11,9 ^b	2,663	<0,001
iC5 (mM/100 mM)	2,17 ^a	2,42 ^b	0,493	<0,001
C5 (mM/100 mM)	1,03 ^a	1,37 ^b	0,230	<0,001
iC6 (mM/100 mM)	0,010	0,010	0,0006	0,877
C6 (mM/100 mM)	0,256 ^a	0,524 ^b	0,1130	<0,001
C7 (mM/100 mM)	0,008 ^a	0,027 ^b	0,0027	<0,001
C2:C3	3,97 ^b	3,68 ^a	0,030	<0,001

^{a,b,c} – Na mesma linha, médias com notações diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

MS – matéria seca; AGV – ácidos gordos voláteis; C2 – ácido acético; C3 – ácido propiónico; iC4 - ácido *iso*-butírico; C4 – ácido butírico; iC5 – ácido *iso*-valérico; C5 – ácido valérico; iC6 - ácido *iso*-caproico; C6 - ácido caproico; C7 - ácido enântico; C2:C3 – rácio ácido acético:ácido propiónico; EPM – erro padrão da média.

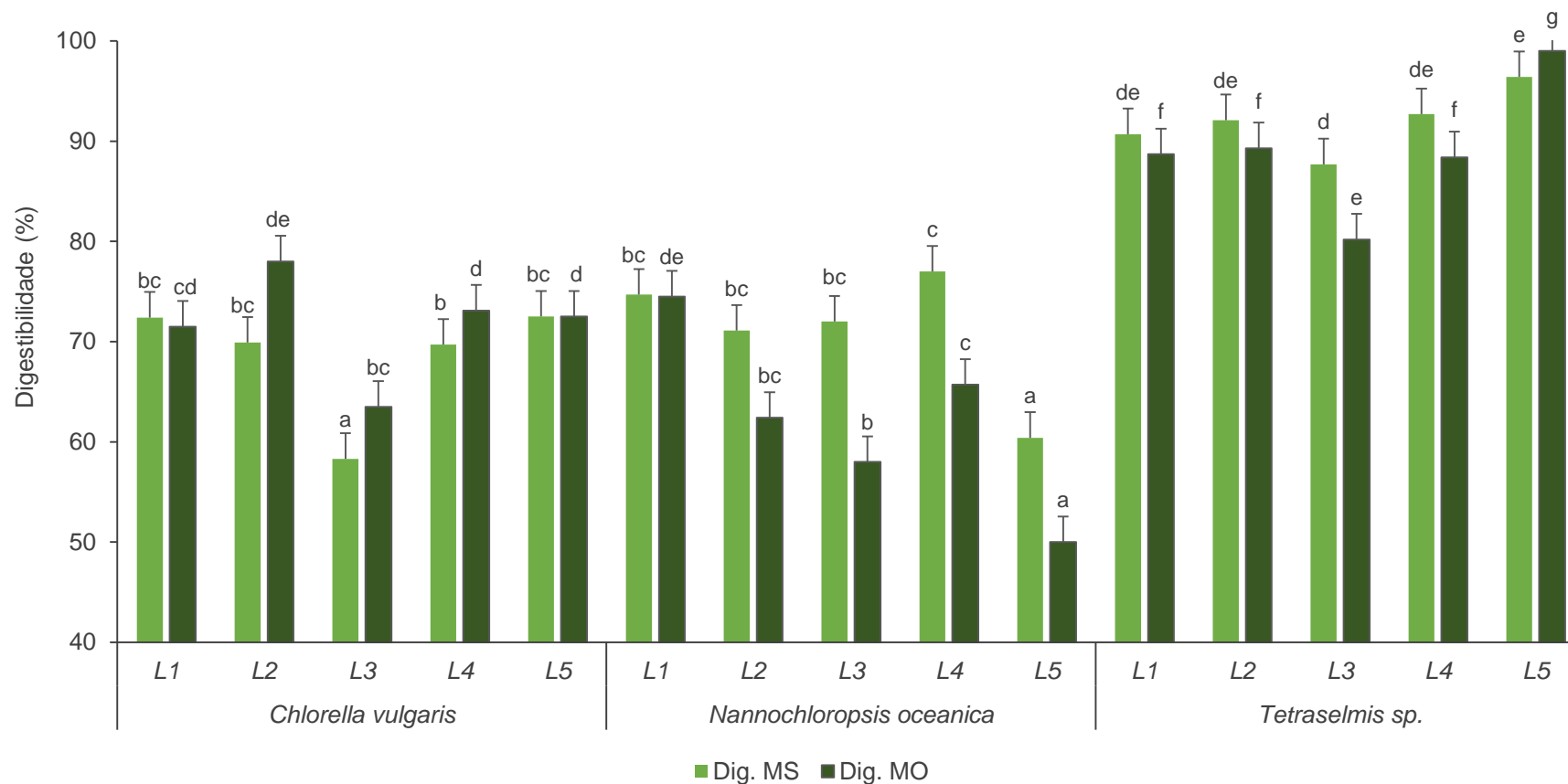


Figura 8. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) dos cinco lotes de produção das espécies *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* e *Tetraselmis sp.* em animais monogástricos. Barras com notações diferentes (a, b, c) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O uso de silagem de milho como substrato base promoveu um aumento de todos os parâmetros medidos, excetuando o pH, a proporção em ácido acético e o rácio ácido acético:ácido propiónico que foram significativamente superiores quando foi utilizada palha de trigo como substrato (Quadro 6).

No que se refere à digestibilidade, tanto Dig. MS como Dig. MO, os valores mais elevados foram obtidos com silagem de milho como substrato base (silagem de milho: Dig. MS 83,7%, Dig. MO 80,8%, na MS; palha de trigo: Dig. MS 67,2%, Dig. MO 60,7%, na MS) (Figura 9).

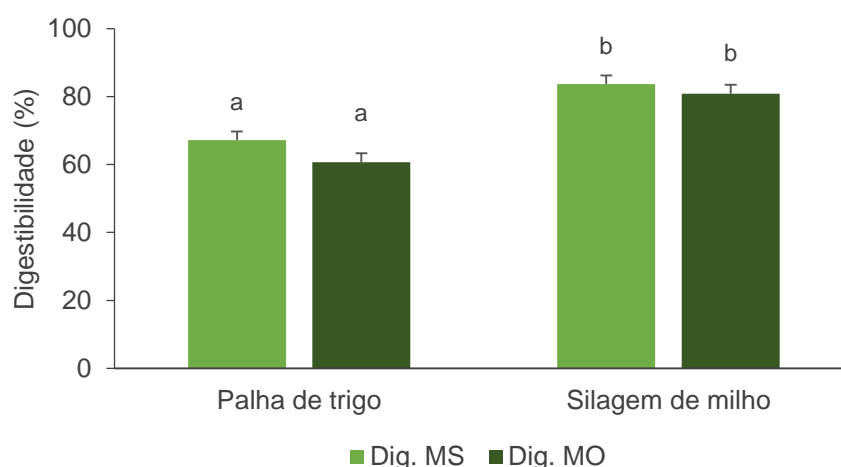


Figura 9. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) dos substratos base (palha de trigo e silagem de milho) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes (^a, ^b) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O efeito das microalgas nos parâmetros de fermentação foi comparado com o efeito do substrato base, utilizados como controlo (Quadro 7). Após 48 h de incubação, a produção de gás, as proporções dos ácidos propiónico, butírico, caproico e enântico, e o rácio ácido acético:ácido propiónico não diferiram significativamente entre o controlo (substrato base sem suplementação de microalga) e a inclusão de 10% de microalgas ($P > 0,05$). Contrariamente, o pH, a produção total de AGV e a proporção de *iso*-caproico foram mais reduzidos com inclusão de microalgas do que com controlo ($P < 0,001$), enquanto as proporções dos teores em ácidos *iso*-butírico, *iso*-valérico e valérico foram superiores ($P < 0,001$). A inclusão de microalgas tendeu a diminuir a produção de metano ($P = 0,061$) e a proporção de ácido acético ($P = 0,054$), comparativamente ao controlo.

A espécie de microalga não afetou significativamente as proporções dos ácidos acético, propiónico, butírico, *iso*-caproico e enântico e o rácio ácido acético:ácido propiónico (Quadro 7). A produção de gás foi significativamente superior com *N. oceanica* e inferior com *Tetraselmis* sp. Esta última promoveu o menor valor de

Quadro 7. Efeito do controlo (substrato base) e da inclusão de 10% (g/100 g matéria seca) das espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis* sp.) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação *in vitro* com inóculo ruminal tamponado.

	Controlo	EPM	P	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.	EPM	P
Gás (mL/g MS)	224	58,7	0,125	215 ^b	222 ^c	207 ^a	39,6	<0,001
Metano (mL/g MS)	24,5	8,01	0,061	23,1 ^b	23,8 ^b	21,2 ^a	8,12	0,001
pH	6,43*	0,047	<0,001	6,34 ^a	6,39 ^{ab}	6,42 ^b	0,023	0,008
Total AGV (mM/g MS)	10,7*	1,19	<0,001	9,82 ^a	10,6 ^c	10,3 ^b	0,85	<0,001
C2 (mM/100 mM)	67,7	1,89	0,054	66,9	67,1	67,0	2,77	0,626
C3 (mM/100 mM)	17,6	1,11	0,868	17,5	17,5	17,8	0,88	0,239
iC4 (mM/100 mM)	1,09*	0,095	<0,001	1,23 ^b	1,19 ^a	1,17 ^a	0,140	0,001
C4 (mM/100 mM)	10,1	2,31	0,485	10,4	10,2	10,2	2,66	0,300
iC5 (mM/100 mM)	2,09*	0,349	<0,001	2,37 ^c	2,30 ^b	2,22 ^a	0,493	<0,001
C5 (mM/100 mM)	1,09*	0,164	<0,001	1,19 ^a	1,24 ^b	1,17 ^a	0,230	<0,001
iC6 (mM/100 mM)	0,0121*	0,00126	<0,001	0,00963	0,0102	0,0103	0,00063	0,621
C6 (mM/100 mM)	0,385	0,0788	0,752	0,409 ^b	0,394 ^b	0,368 ^a	0,0113	<0,001
C7 (mM/100 mM)	0,0166	0,00335	0,415	0,0184	0,0187	0,0164	0,00273	0,067
C2:C3	3,86	0,130	0,113	3,84	3,84	3,79	0,037	0,586

* - Diferença significativa entre controlo e inclusão de microalgas ($P < 0,05$).

^{a,b,c} – Na mesma linha, médias com notações diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

MS – matéria seca; AGV – ácidos gordos voláteis; C2 – ácido acético; C3 – ácido propiónico; iC4 - ácido *iso*-butírico; C4 – ácido butírico; iC5 – ácido *iso*-valérico; C5 – ácido valérico; iC6 - ácido *iso*-caproico; C6 - ácido caproico; C7 - ácido enântico; C2:C3 – rácio ácido acético:ácido propiónico; EPM – erro padrão da média.

produção de metano, não tendo sido observadas diferenças significativas entre a *N. oceanica* e a *C. vulgaris*. No final da incubação, o pH foi significativamente mais baixo com *C. vulgaris* e mais elevado com *Tetraselmis* sp. Já a produção total de AGV foi superior com a *N. oceanica* e inferior com a *C. vulgaris*. A proporção dos ácidos iso-butírico e iso-valérico foram superiores com *C. vulgaris*. A maior proporção de ácido valérico foi obtida com *N. oceanica*, não tendo sido observadas diferenças entre a *C. vulgaris* e a *Tetraselmis* sp. Esta última promoveu a menor proporção de ácido caproico (Quadro 7).

A Dig. MS e a Dig. MO do controlo (substrato base não suplementado) foi superior à das três espécies de microalgas estudadas (Figura 10). De entre estas, a *C. vulgaris* foi a de menor digestibilidade e a *Tetraselmis* sp. a de maior.

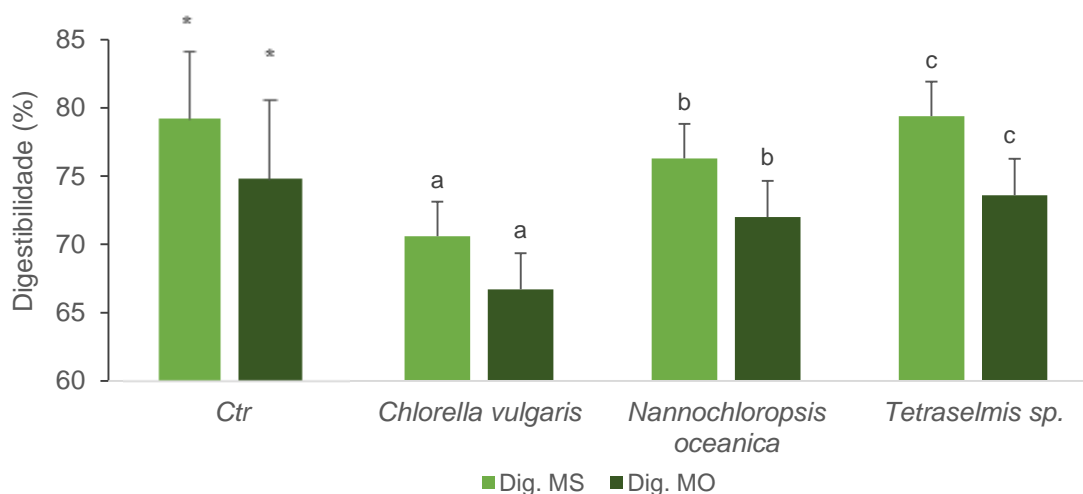


Figura 10. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, % na MS) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) do controlo (substratos base) e da inclusão de 10% (g/100 g matéria seca) das espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis* sp.) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes (^a, ^b, ^c) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O Quadro 8 apresenta o efeito do lote de produção de cada microalga nos parâmetros fermentativos após 48 h de incubação *in vitro*. A produção de gás foi significativamente inferior nos lotes 3 da *C. vulgaris* e da *Tetraselmis* sp. e no lote 4 da *N. oceanica*. A produção de metano não diferiu significativamente entre lotes da *C. vulgaris* e da *N. oceanica*, mas foi mais reduzida no lote 3 da *Tetraselmis* sp. O lote 5 da *C. vulgaris* foi o que promoveu maior produção de AGV, não tendo sido verificadas diferenças entre lotes de produção da *N. oceanica* e da *Tetraselmis* sp. O lote 4 da *C. vulgaris* foi o que promoveu uma maior proporção de ácido acético e o lote 1 a menor; o lote de produção não afetou significativamente proporção de ácido acético de *N. oceanica* e de *Tetraselmis* sp. Para a *C. vulgaris*, o lote 4 foi o que apresentou menores

Quadro 8. Efeito do lote (L) de produção (L1, L2, L3, L4, L5) das espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis* sp.) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação *in vitro* com inóculo ruminal tamponado.

	<i>Chlorella vulgaris</i>					<i>Nannochloropsis oceanica</i>					<i>Tetraselmis</i> sp.					EPM	P
	L1	L2	L3	L4	L5	L1	L2	L3	L4	L5	L1	L2	L3	L4	L5		
Gás (mL/g MS)	212 ^{bc}	218 ^{bc}	203 ^b	220 ^c	221 ^c	220 ^c	225 ^c	227 ^c	214 ^{bc}	224 ^c	224 ^c	210 ^{bc}	188 ^a	207 ^{bc}	206 ^{bc}	39,9	0,002
Metano (mL/g MS)	22,6 ^{bc}	23,4 ^{bc}	21,8 ^{bc}	23,4 ^{bc}	24,2 ^{bc}	23,8 ^{bc}	24,4 ^c	23,8 ^{bc}	22,7 ^{bc}	24,2 ^{bc}	24,0 ^{bc}	22,9 ^{bc}	18,5 ^a	19,5 ^{ab}	21,4 ^b	8,17	0,033
pH	6,36	6,22	6,36	6,38	6,36	6,39	6,36	6,39	6,42	6,40	6,41	6,42	6,42	6,42	6,44	0,043	0,433
Total AGV (mM/g MS)	9,52 ^a	9,45 ^a	9,61 ^{ab}	9,81 ^{ab}	10,7 ^c	10,6 ^{bc}	10,7 ^c	10,6 ^{bc}	10,4 ^{bc}	10,5 ^{bc}	10,1 ^b	10,5 ^{bc}	10,1 ^b	10,3 ^{bc}	10,3 ^{bc}	0,87	0,001
C2 (mM/100 mM)	66,1 ^a	66,2 ^{ab}	66,6 ^{ab}	68,1 ^c	67,4 ^{bc}	67,3 ^{bc}	67,4 ^{bc}	66,9 ^{ab}	67,0 ^{ab}	67,0 ^{ab}	66,7 ^{ab}	66,9 ^{ab}	67,2 ^{bc}	67,1 ^b	67,1 ^b	2,79	0,008
C3 (mM/100 mM)	17,6	17,8	17,8	17,0	17,1	17,3	17,4	17,6	17,7	17,6	17,7	17,7	17,9	18,0	17,7	0,94	0,904
iC4 (mM/100 mM)	1,27 ^b	1,29 ^c	1,27 ^b	1,13 ^a	1,20 ^{ab}	1,19 ^{ab}	1,18 ^{ab}	1,20 ^b	1,18 ^{ab}	1,19 ^{ab}	1,20 ^b	1,20 ^b	1,15 ^{ab}	1,15 ^{ab}	1,17 ^{ab}	0,142	0,002
C4 (mM/100 mM)	10,7	10,6	10,3	10,1	10,4	10,2	10,1	10,3	10,2	10,3	10,4	10,3	9,99	10,1	10,2	2,67	0,875
iC5 (mM/100 mM)	2,52 ^c	2,46 ^c	2,44 ^{bc}	2,12 ^a	2,30 ^b	2,36 ^{bc}	2,25 ^{ab}	2,36 ^{bc}	2,25 ^{ab}	2,26 ^{ab}	2,35 ^{bc}	2,25 ^{ab}	2,20 ^{ab}	2,15 ^a	2,17 ^{ab}	0,495	<0,001
C5 (mM/100 mM)	1,25 ^{bc}	1,21 ^{bc}	1,17 ^{ab}	1,12 ^a	1,19 ^b	1,24 ^{bc}	1,23 ^{bc}	1,27 ^c	1,23 ^{bc}	1,23 ^{bc}	1,20 ^b	1,18 ^{ab}	1,14 ^{ab}	1,16 ^{ab}	1,17 ^{ab}	0,231	0,015
iC6 (mM/100 mM)	0,011 ^b	0,007 ^a	0,012 ^b	0,010 ^{ab}	0,008 ^{ab}	0,011 ^b	0,009 ^{ab}	0,010 ^{ab}	0,012 ^b	0,009 ^{ab}	0,014 ^b	0,009 ^{ab}	0,010 ^{ab}	0,010 ^{ab}	0,009 ^{ab}	0,0012	0,013
C6 (mM/100 mM)	0,437	0,421	0,400	0,376	0,410	0,395	0,394	0,400	0,389	0,393	0,376	0,373	0,358	0,362	0,371	0,1139	0,586
C7 (mM/100 mM)	0,022	0,020	0,017	0,015	0,018	0,020	0,020	0,019	0,018	0,016	0,016	0,015	0,019	0,016	0,017	0,0031	0,165
C2:C3	3,75	3,73	3,76	4,01	3,94	3,89	3,88	3,81	3,79	3,82	3,77	3,80	3,78	3,77	3,82	0,083	0,530

^{a,b,c} – Na mesma linha, médias com notações diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

MS – matéria seca; AGV – ácidos gordos voláteis; C2 – ácido acético; C3 – ácido propiónico; iC4 - ácido *iso*-butírico; C4 – ácido butírico; iC5 – ácido *iso*-valérico; C5 – ácido valérico; iC6 - ácido *iso*-caproico; C6 - ácido caproico; C7 - ácido enântico; C2:C3 – rácio ácido acético:ácido propiónico; EPM – erro padrão da média.

proporções dos ácidos *iso*-butírico, *iso*-valérico e valérico e o lote 2 o menor perfil em ácido *iso*-caproico. Para a *N. oceanica* o lote não provocou efeito significativo nas proporções dos ácidos *iso*-butírico, *iso*-valérico, valérico e *iso*-caproico. Relativamente à *Tetraselmis* sp., o lote 4 foi o que promoveu menor proporção de ácido *iso*-valérico, não tendo havido diferenças entre lotes nos perfis em ácidos *iso*-butírico, valérico e *iso*-caproico. O lote de produção dentro de cada espécie de microalgas não afetou significativamente o pH, as proporções dos ácidos propiónico, butírico, caproico e enântico, nem o rácio ácido acético:ácido propiónico ($P > 0,05$) (Quadro 8).

O lote de produção de cada microalga afetou significativamente a Dig. MS e a Dig. MO (Figura 11). Estas foram inferiores nos lotes 4 e 5 da *C. vulgaris*, não havendo diferenças entre os restantes lotes. A Dig. MS foi superior nos lotes 1 e 3 da *N. oceanica*, tendo o lote 5 apresentado o menor valor de Dig. MO. Os lotes 3 e 4 da *Tetraselmis* sp. foram os lotes que apresentaram os valores mais elevados de Dig. MS e de Dig. MO.

No Quadro 9 apresenta-se o efeito da interação entre o substrato de base e a espécie de microalga. A interação apenas afetou significativamente a produção total de AGV e a proporção do ácido propiónico. A incubação de *C. vulgaris* com palha de trigo promoveu a menor produção de AGV. Já a incubação de *N. oceanica* foi a que promoveu os valores mais elevados de produção total de AGV, independentemente do substrato utilizado. Contudo, a produção de AGV pela incubação de *N. oceanica* com palha de trigo não foi significativamente diferente da verificada com a incubação de *C. vulgaris* e de *Tetraselmis* sp. com silagem de milho. A proporção do ácido propiónico foi significativamente superior quando a *Tetraselmis* sp. foi incubada com silagem de milho, embora similar à incubação de *N. oceanica* com o mesmo substrato. Não se verificaram diferenças significativas na proporção do ácido propiónico entre os restantes tratamentos.

A Dig. MS e a Dig. MO foram sempre superiores quando as microalgas foram incubadas com silagem de milho do que com palha de trigo (Figura 12). O valor mais elevado de Dig. MS foi obtido com a incubação de *Tetraselmis* sp. com silagem de milho (88,4%), enquanto os valores mais elevados de Dig. MO foram obtidos com a incubação de *Tetraselmis* sp. ou de *N. oceanica* com silagem de milho (respetivamente, 85,7% e 84,5%, na MS).

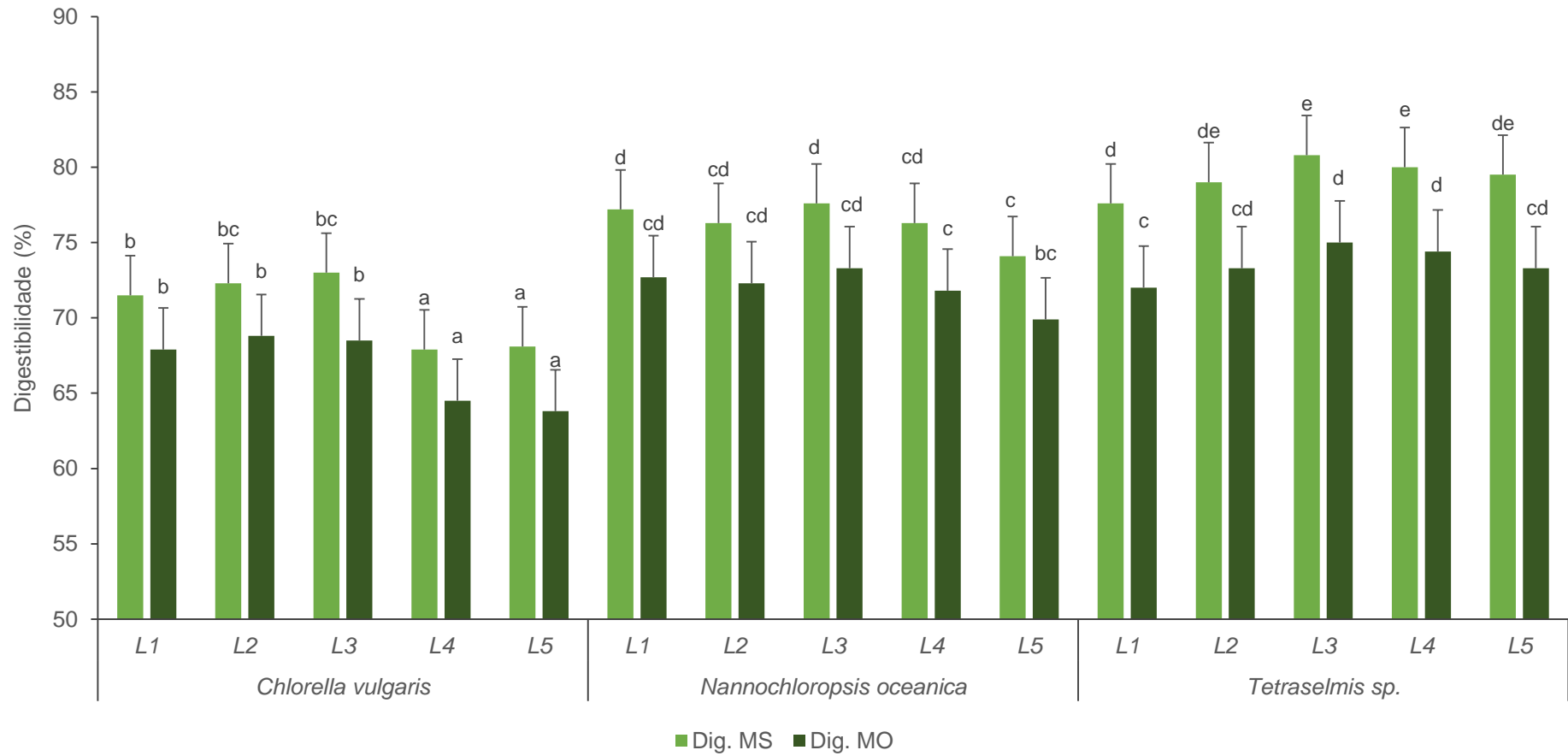


Figura 11. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) dos lotes (L) de produção (L1, L2, L3, L4, L5) das espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis sp.*) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes (^{a, b, c}) são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Quadro 9. Efeito da interação entre substrato base (palha de trigo e silagem de milho) e espécie de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis* sp.) na produção de gás e de metano, no pH, na produção total e proporção de ácidos gordos voláteis após 48 h de incubação *in vitro* com inóculo ruminal tamponado.

	Palha de trigo			Silagem de milho			EPM	P
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.		
Total AGV (mM/g MS)	9,40 ^a	10,4 ^{cd}	10,2 ^b	10,3 ^{bc}	10,7 ^d	10,3 ^{bc}	0,86	0,011
C2 (mM/100 mM)	68,8	69,4	69,4	65,0	64,8	64,6	2,77	0,062
C3 (mM/100 mM)	17,6 ^a	17,4 ^a	17,4 ^a	17,3 ^a	17,7 ^{ab}	18,2 ^b	0,90	0,049
iC4 (mM/100 mM)	1,22	1,16	1,13	1,25	1,23	1,22	0,141	0,086
iC6 (mM/100 mM)	0,0093	0,0096	0,0114	0,0100	0,0107	0,0093	0,00082	0,068
C2:C3	3,92	4,00	3,99	3,76	3,68	3,59	0,053	0,071

^{a,b,c} – Na mesma linha, médias com notações diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

MS – matéria seca; AGV – ácidos gordos voláteis; C2 – ácido acético; C3 – ácido propiónico; iC4 - ácido *iso*-butírico; iC6 - ácido *iso*-caproico; C2:C3 – rácio ácido acético:ácido propiónico;

EPM – erro padrão da média.

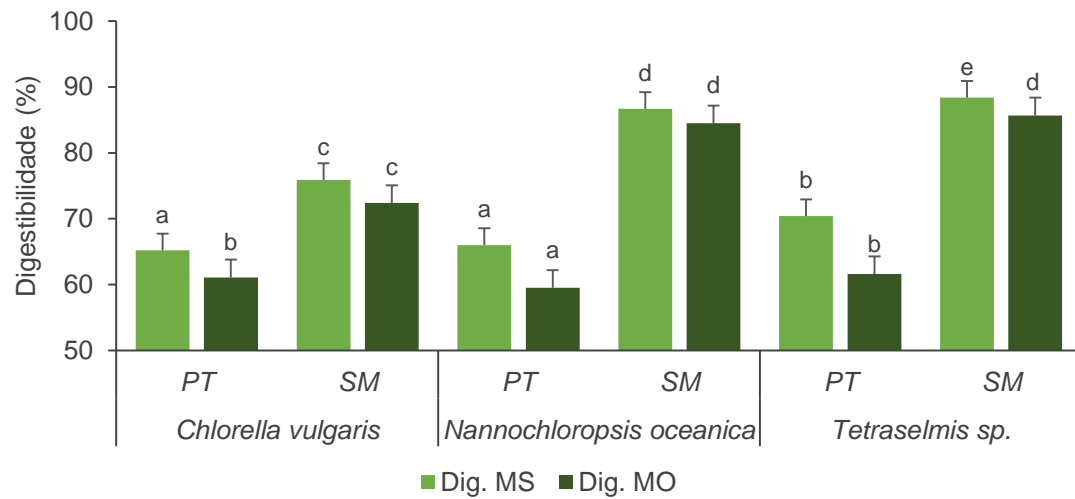


Figura 12. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig. MS, %) e da matéria orgânica (Dig. MO, % na MS) da interação entre o substrato base (palha de trigo, PT, e silagem de milho, SM) e as espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, e *Tetraselmis sp.*) em animais ruminantes. Barras com notações diferentes (a, b, c) são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

5. Discussão

5.1. Composição química

A composição química diferiu significativamente entre as três espécies de microalgas estudadas, o que vai ao encontro do reportado na bibliografia (e.g., Bernaerts *et al.*, 2018, Converti *et al.*, 2009; Hu, 2004). O teor em cinza de todas as espécies estudadas foi superior ao referido anteriormente. De facto, os valores na bibliografia rondam (na MS) 14,1% a 19,1% para a *Tetraselmis* sp. (Das *et al.*, 2016); 6,3% a 9,5% para a *C. vulgaris* (Kholif *et al.*, 2017; Tokuşoglu e Ünal, 2003) e 14,4% para a *Nannochloropsis* sp. (Wild *et al.*, 2018a), e os valores por nós determinados foram de 12,3% para a *C. vulgaris*, 27,8% para a *N. oceanica* e 28,3% para a *Tetraselmis* sp..

A proteína é um dos principais componentes da biomassa microalgal, tendo sido, nas espécies estudadas, acima dos 20%. O teor em PB foi superior na *C. vulgaris* (45,2%, na MS), intermédio na *N. oceanica* (28,7%, na MS) e inferior na *Tetraselmis* sp. (21,2%, na MS). Estudos anteriores referem teores de PB em *C. vulgaris* de 33,0% a 51,5% na MS (Janczyk *et al.*, 2005; Kholif *et al.*, 2017; Seyfabadi *et al.*, 2011; Wild *et al.*, 2018b) dependendo das condições de cultivo. O teor em PB da *N. oceanica* obtido no presente trabalho vai ao encontro do referido anteriormente por Reboloso-Fuentes *et al.* (2001) (28,8%, na MS), mas inferior ao referido por Wild *et al.* (2018a; 43,1%, na MS). Já o teor em PB da *Tetraselmis* sp. foi inferior aos referidos por Schwenzfeier *et al.* (2011) e Das *et al.* (2016) de 28,8% a 36,0% na MS. As diferenças encontradas podem ser devidas à utilização de diferentes fatores de conversão do N em PB. De facto, diferentes autores têm utilizado fatores de conversão que variam entre 4,44 e 6,25 (Bernaerts *et al.*, 2018), o que dificulta a comparação direta entre valores de PB de diferentes estudos e poderá levar à subvalorização ou sobrevalorização desta fração. Neste trabalho, o fator de conversão usado para as microalgas foi o sugerido por Lourenço *et al.* (2004) de 4,78.

A fração lipídica das microalgas mostrou, também, diversidade entre as espécies. A *N. oceanica*, com 12,8% na MS, foi a alga mais rica em GB, seguida pela *C. vulgaris*, com 7,68% na MS, e, por fim, pela *Tetraselmis* sp., com 6,35% na MS. Valores semelhantes foram encontrados para o género *Nannochloropsis* (17,1% a 25,5%, na MS; Bi e He, 2013) e para a *C. vulgaris* (5,80% a 7,50%, na MS; Novriadi e Proano, 2018; Ross, 2001) e mais baixos para a *Tetraselmis maculata* (2,9%, na MS; Ross, 2001). Diferenças no teor em GB podem ser reflexo de diferentes condições de cultivo. De facto, é conhecido que as microalgas verdes alteram a sua composição química,

com particular aumento da fração lipídica, como forma de adaptação a diferentes condições de cultivo, como défice ou excesso de N e alterações de temperatura (Bernaerts *et al.*, 2018; Ördög *et al.*, 2016).

Quanto à fração FDN, a *Tetraselmis* sp. foi a alga com menor teor em hidratos de carbono estruturais (16,2%, na MS), seguida pela *N. oceanica* (29,8%, na MS), sendo a *C. vulgaris* a que apresentou o teor mais elevado (49,0%, na MS). A fração FDN corresponde à celulose, hemicelulose e lenhina presentes nos alimentos, sendo de particular importância avaliar em alimentos para animais ruminantes, dado estes possuírem a mais-valia de parte da celulose e hemicelulose ser fermentada pela micropopulação ruminal (Van Soest *et al.*, 1991). No melhor dos nossos conhecimentos, este relatório reporta, pela primeira vez, a composição em FDN das espécies *C. vulgaris*, *N. oceanica* e *Tetraselmis* sp. O único outro estudo que avaliou esta fração foi o de Mišurcová *et al.* (2010), com *Chlorella pyrenoidosa*, que apresentou 2,21% na MS. Para os animais monogástricos é usualmente determinada a fração de fibra bruta, uma vez que a fermentação microbiana do cólon tem pouca expressão para o hospedeiro. Devido a questões metodológicas colocadas pelo diminuto diâmetro das microalgas, não nos foi possível adaptar o método a tempo dos resultados serem incluídos no presente relatório.

O amido constitui um hidrato de carbono de reserva de algumas microalgas, particularmente das pertencentes à classe Chlorophyceae, como os géneros *Chlorella* e *Tetraselmis* (Gifuni *et al.*, 2018). Em concordância, a *Tetraselmis* sp. apresentou maior teor em amido (13,9%, na MS), seguida pela *C. vulgaris* (4,34%, na MS) e, por fim, pela *N. oceanica*, com menos de 1% (na MS). No entanto, os teores em amido obtidos foram inferiores aos reportados para a *C. vulgaris* (41% a 60%, na MS; Dragone *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2012) e para a *Tetraselmis subcordiformis* (49,3% a 62,1%, na MS; Yao *et al.*, 2012). O baixo teor em amido da *N. oceanica* (0,938%, na MS) deve-se ao facto do principal hidrato de carbono de reserva desta microalga ser a crisolaminarina, também designada de leucosina (Dong *et al.*, 2013).

O lote de produção também afetou significativamente a composição química de todas as espécies de microalgas estudadas. É bem conhecido que as condições de cultivo tais como a intensidade e quantidade de luz, a temperatura e o défice ou excesso de nutrientes disponíveis podem afetar a composição química das microalgas (Hu, 2004; Kotrbáček *et al.*, 2015; Volkman e Brown, 2006). Contudo, neste estudo, não nos é possível inferir a origem das diferenças observadas entre lotes, por não terem sido disponibilizadas os detalhes das condições de cultivo. Contudo, tendo todos os lotes sido cultivados ao ar livre, tal como referido anteriormente, podemos sugerir que as

condições climatéricas tenham impactado a composição química dos diferentes lotes de produção. No contexto de formulação de regimes alimentares equilibrados e que promovam a eficiência alimentar, a variação significativa entre lotes torna imperiosa a avaliação, em rotina, do valor nutritivo das microalgas, razão pela qual se avaliou a digestibilidade *in vitro* para animais monogástricos e para animais ruminantes.

5.2. Digestibilidade *in vitro* em animais monogástricos

A digestibilidade das microalgas afeta a sua utilização na alimentação animal. A parede celular pode ter um efeito significativo nos valores de digestibilidade. A parede celular das microalgas eucarióticas consiste numa fina camada celulósica, pelo que a existência desta parede celulósica rígida pode condicionar a obtenção de elevados valores de digestibilidade (Monks *et al.*, 2013).

No presente trabalho, a digestibilidade *in vitro* em monogástricos foi determinada utilizando várias enzimas para simular a digestibilidade de todo o trato digestivo do animal. Com efeito, foi utilizada pepsina para simular a digestão estomacal, pancreatina para simular a digestão intestinal e Viscozyme®, complexo multienzimático com atividades celulolítica, hemicelulolítica, xilanolítica, arabinolítica e β -glucanolítica, para simular a digestão no colón (Boisen e Fernández, 1997).

Os resultados aqui apresentados foram obtidos após modificação da porosidade dos cadinhos de 40-100 μm (P2; Boisen e Fernández, 1997) para 10-16 μm (P4) com enchimento de celite (adjuvante de filtração) entre papéis de filtro de baixa porosidade e isentos de cinza (porosidade 4-7 μm). No entanto, face ao reduzido diâmetro das microalgas e ao facto de terem sido fornecidas secas por *spray*, que poderá ter reduzido a sua granulometria, a digestibilidade *in vitro* das espécies e lotes de produção das microalgas poderá ter sido sobrestimada, devido a eventuais perdas do material não digerido por filtração. Para avaliar esta hipótese, estão a ser conduzidos, de momento, novos ensaios, nos quais a etapa de filtração sofreu nova modificação, sendo agora feita através de um filtro de membrana de vidro de 1,6 μm de porosidade, inferior ao diâmetro de qualquer uma das espécies estudadas. Face à morosidade da metodologia analítica, não foi possível incluir os novos resultados no presente relatório, sendo apresentados, como resultados preliminares, os obtidos com a primeira modificação do método.

Os valores de Dig. MS obtidos variaram entre 68,8% na *C. vulgaris* e 91,9%, na *Tetraselmis* sp. Já a Dig. MO (na MS) variou entre 62,1% na *N. oceanica* e 89,1% na *Tetraselmis* sp.

A comparação entre os resultados aqui obtidos e trabalhos anteriores é dificultada pela ausência de estudos de avaliação das mesmas espécies de microalgas e com o mesmo método de estimativa da digestibilidade *in vitro*. A título de exemplo, a digestibilidade *in vitro* da MS de *C. pyrenoidosa* obtida pela utilização de apenas pepsina, apenas pancreatina ou uma junção de ambas foi, respetivamente de 60,9%, 79,1% e 75,3% (Mišurcová *et al.*, 2010). Contudo, noutro estudo (Machů *et al.*, 2014), a digestibilidade da MS da *C. pyrenoidosa* obtida, também, apenas utilizando pepsina, pancreatina ou a combinação das duas enzimas, mas em tempos diferentes foi, respetivamente, de 50% a 63,5%, 58,3% a 83,9% e 69,6% a 89,7%.

Alguns estudos não procedem à avaliação de algas isoladas, mas sim de misturas de algas ou de dietas contendo alga. Exemplificando, Moheimani *et al.* (2018) avaliou a digestibilidade *in vitro* da MO (digestibilidade total) de um consórcio de microalgas (*Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.), tendo obtido valores entre 56,7% e os 59,2%. Para além destes estudos, foi realizado por Furbeyre *et al.* (2017) um ensaio *in vivo* onde foi avaliada a digestibilidade total da MO da dieta com inclusão de 1% de *Chlorella* desidratada fornecida a leitões pós-desmame, tendo sido obtido valores superiores 93%.

Os valores superiores de Dig. MS e de Dig. MO foram observados com a microalga *Tetraselmis* sp. Este facto vai ao encontro do menor teor em constituintes da parede celular desta microalga quando comparada com as restantes. Contudo, esta relação entre o teor em FDN e a digestibilidade não se verificou para as restantes duas espécies de microalgas. Com efeito, não se verificaram diferenças significativas entre a Dig. MS da *C. vulgaris* e da *N. oceanica*, e a Dig. MO da *C. vulgaris* foi significativamente superior. Estes resultados sugerem que mais do que o teor em constituintes da parede celular, importa a composição da parede celular que condiciona a disponibilidade da biomassa no trato digestivo. Considerando que as microalgas não possuem lenhina (Chen *et al.*, 2013), macromolécula totalmente indigestível para animais mamíferos, os valores inferiores de digestibilidade sugerem um menor grau de hidrólise da parede celular, reflexo da sua estrutura.

Os lotes de produção afetaram significativamente a Dig. MS e a Dig. MO das microalgas estudadas. No entanto, também não foi observada uma relação inversamente proporcional entre o teor em FDN e a digestibilidade. Os resultados obtidos mostram claramente que as alterações da composição química resultantes de fatores climáticos e/ou de disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo têm um forte impacto na digestibilidade das microalgas. Contudo, carece ainda identificar os fatores nutricionais que mais influenciam este efeito.

Comparando os valores obtidos com a digestibilidade *in vitro* de fontes proteicas comumente utilizadas na prática (Park *et al.*, 2016), como o bagaço de soja (74,6% Dig. MS), o bagaço de colza (64,5% Dig. MS) e o bagaço de algodão (56,6% Dig. MS), qualquer uma das espécies de microalgas estudadas, independentemente do lote de produção, mostra potencial para ser utilizada como fonte alimentar na alimentação de monogástricos. É necessário, porém, validar os resultados obtidos em ensaios com animais.

5.3. Digestibilidade *in vitro* em animais ruminantes

À semelhança dos ensaios de digestibilidade *in vitro* em monogástricos, estão a ser repetidos os ensaios de digestibilidade *in vitro* em ruminantes, de modo a assegurar que a Dig. MS e Dig. MO não são sobrestimadas por perdas de filtração do material algal não digerido. Assim, estão a ser repetidas as incubações, parâmetros fermentativos e digestibilidade das espécies e lotes de produção das microalgas, sendo que a digestibilidade será determinada após filtração do meio fermentado hidrolisado, a quente, com solução de detergente neutro, por filtros de membrana de vidro de 1,6 µm de porosidade; inferior ao diâmetro de qualquer uma das espécies estudadas. Face à morosidade dos procedimentos analíticos, não é possível apresentar os resultados obtidos com a referida modificação metodológica. Assim, à semelhança dos apresentados no tópico 5.2, os resultados aqui apresentados são preliminares.

O efeito das três espécies de microalgas nos parâmetros de fermentação foi avaliado em ensaio *batch* incubando cada lote de produção a um nível de 10% com dois substratos base (palha de trigo e silagem de milho) durante 48 h.

A utilização de silagem de milho como substrato base, quando comparada com a palha de trigo, diminuiu o pH e aumentou a produção total de gás, de metano e de AGV, sugerindo uma maior extensão de fermentação e indo ao encontro de resultados anteriores (Maia *et al.*, 2016). O perfil em AGV foi, também, afetado pelo substrato base, tendo a silagem de milho diminuído os teores em ácidos acético e butírico e o rácio ácido acético:ácido propiónico. Com efeito, é bem sabido que alimentos ricos em hidratos de carbono não estruturais (*e.g.*, amido) dirigem a fermentação para a produção de propionato e os alimentos ricos em fibra aumentam a produção de acetato e de butirato (Friggens *et al.*, 1998). Os valores superiores de Dig. MS e Dig. MO obtidos com silagem de milho corroboram a sugestão de que este substrato promoveu a fermentação ruminal.

A inclusão de microalgas aumentou os teores em ácidos *iso*-butírico, *iso*-valérico e valérico, diminui o pH, a produção total de AGV e a proporção de ácido *iso*-caproico e

tendeu a diminuir a produção de metano ($P = 0,061$) e os teores em ácidos acético ($P = 0,054$) quando comparado com o controlo (apenas substratos base). Estes efeitos refletem a alteração da composição química da biomassa incubada, nomeadamente o aumento do teor em PB e a diminuição do teor em FDN com a inclusão de microalgas. A maior Dig. MS e Dig. MO do controlo relativamente à inclusão de microalgas está de acordo com os efeitos observados na produção total de AGV e no pH.

A espécie de microalga afetou significativamente a produção total de gás, de metano, de AGV, o pH e a Dig. MS e a Dig. MO. A *Tetraselmis* sp. promoveu os menores valores de produção de gás e de metano, apesar de apresentar a maior Dig. MS e Dig. MO. Estes resultados poderiam ser explicados, pelo menos parcialmente, pelo menor teor em FDN e maior teor em amido desta microalga que pode ter direcionado a fermentação para a produção de propionato que consome hidrogénio, diminuindo, assim, a quantidade de hidrogénio disponível para a metanogénese (Morgavi *et al.*, 2010). Contudo, a espécie de microalga não afetou significativamente os teores em ácidos acético e propiónico, nem o seu rácio. Neste ponto, saliente-se que os valores de digestibilidade referem-se à digestibilidade em todo o trato digestivo e não apenas a fermentação no rúmen. Com efeito, apesar da digestibilidade da *Tetraselmis* sp. ser superior à das restantes, a produção de AGV com esta alga foi intermédia e o pH foi o mais elevado.

A produção de metano não foi significativamente diferente entre a *C. vulgaris* e a *N. oceanica*. Contudo, seria de esperar que o maior teor em GB da *N. oceanica* reduzisse a produção de metano dado a biohidrogenação dos ácidos gordos no rúmen constituir uma via de utilização de hidrogénio (Jenkins *et al.*, 2008).

A produção total de AGV e a digestibilidade foi superior com a *N. oceanica* e inferior com a *C. vulgaris*, sugerindo efeito da composição da parede celular no grau de hidrólise enzimática. Isto não é, contudo, suportado pelo pH no final da incubação que foi significativamente mais baixo com *C. vulgaris*. Pelo contrário, em estudo realizado por Tibbetts *et al.* (2015), a Dig. MO da *Nannochloropsis bacillaris* foi sempre inferior à da *C. vulgaris*, independentemente do nível de inclusão de alga (25, 50 e 100%). Já Anele *et al.* (2016) obteve valores de Dig. MS semelhantes entre estas microalgas.

Apesar dos diferentes teores em FDN e em amido da *N. oceanica* e da *C. vulgaris*, não houve diferenças significativas entre elas na produção de metano. Os teores em ácidos *iso*-butírico e *iso*-valérico foram superiores com *C. vulgaris*, indo ao encontro do maior teor em PB desta microalga.

O lote de produção afetou significativamente os parâmetros de fermentação e a digestibilidade. Dada a variação entre lotes na composição química das microalgas, este

efeito não é surpreendente. Permanece, no entanto, a questão da origem destas diferenças, tal como referido anteriormente.

A interação entre o substrato de base e a espécie de microalga afetou significativamente a produção total de AGV e o teor em ácido propiónico. Enquanto a incubação de *C. vulgaris* com palha de trigo reduziu a produção de AGV relativamente à sua incubação com silagem de milho, os efeitos da *N. oceanica* e da *Tetraselmis* sp. foram independentes do substrato. O teor em ácido propiónico foi independente do substrato com a *C. vulgaris* e a *N. oceanica*, mas diferiu quando a *Tetraselmis* sp. foi incubada com diferentes substratos. A interação entre o substrato e a espécie de microalga afetou, também, a Dig. MS e a Dig. MO. O valor mais elevado de digestibilidade da MS foi obtido com a incubação de *Tetraselmis* sp. com silagem de milho enquanto os valores mais elevados de digestibilidade da MO foram obtidos com a incubação de *Tetraselmis* sp. ou de *N. oceanica* com silagem de milho. O efeito do substrato base utilizado nas incubações *in vitro* não tem sido muito estudado, mas trabalho recente (Maia *et al.*, 2016) sugere a necessidade de avaliação dos ingredientes alimentares com diferentes substratos.

6. Conclusão

A composição química das microalgas estudadas suporta o valor destes recursos enquanto ingrediente / suplemento a ser utilizado na alimentação animal. Uma vez que a composição química diferiu substancialmente entre espécies, estas podem ser utilizadas para diferentes fins, como fontes de diferentes nutrientes, para espécies alvo e para a obtenção de objetivos de produção.

Os valores relativamente elevados de Dig. MS e Dig. MO de todas as microalgas e lotes estudados sugerem que poderão ser facilmente digeridos e utilizados por animais monogástricos e ruminantes. A *Tetraselmis* sp. apresentou a maior digestibilidade quer em animais monogástricos, quer em animais ruminantes. Em animais monogástricos não houve diferenças entre a *C. vulgaris* e a *N. oceanica*, mas em animais ruminantes, a *C. vulgaris* foi a que apresentou menor digestibilidade.

Contudo, a elevada variação entre lotes de produção relativamente à composição química e digestibilidade, tornam essencial a avaliação, por rotina, do valor nutritivo destas fontes alimentares alternativas. Esta variação entre lotes confere a possibilidade de manipulação das condições de cultivo das microalgas de forma a valorizar componentes específicos importantes para cada espécie animal, estadio fisiológico e sistema de produção.

Mais estudos são necessários para identificar os compostos responsáveis pelos efeitos verificados, tais como a análise detalhada da fração dos diferentes macronutrientes, o perfil em minerais, a cinética da degradação, entre outros, bem como para validar os resultados nos animais vivos, pois o efeito dos compostos bioativos não é possível de simular em ensaios *in vitro*.

7. Referências bibliográficas

- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, 11(1), 96.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. Rome:FAO.
- Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R., & Martini, M. (2018). Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality—A Review. *Livestock Science*, 214, 25-35.
- Anele, U., Yang, W., McGinn, P., Tibbetts, S., & McAllister, T. (2016). Ruminant *in vitro* gas production, dry matter digestibility, methane abatement potential, and fatty acid biohydrogenation of six species of microalgae. *Canadian Journal of Animal Science*, 96(3), 354-363.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of the AOAC* (17th ed.): Association of Official Analytical Chemists.
- Barone, R. S. C., Sonoda, D. Y., Lorenz, E. K., & Cyrino, J. E. P. (2018). Digestibility and pricing of *Chlorella sorokiniana* meal for use in tilapia feeds. *Scientia Agricola*, 75(3), 184-190.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164-173.
- Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- Becker, E. W. (2013). Microalgae for human and animal nutrition. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 461-503.
- Bennamoun, L., Afzal, M. T., & Léonard, A. (2015). Drying of alga as a source of bioenergy feedstock and food supplement—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 1203-1212.
- Bernaerts, T. M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Kermani, Z. J., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M.F., & Van Loey, A. M. (2018). Comparison of microalgal biomasses

- as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Research*, 32, 150-161.
- Bi, Z., & He, B. B. (2013). Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. *Transactions of the ASABE*, 56(4), 1529-1539.
- Bichi, E., Hervás, G., Toral, P. G., Llor, J. J., & Frutos, P. (2013). Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 524-532.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., & Fievez, V. (2008). Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4714-4727.
- Boisen, S., & Fernández, J. A. (1997). Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. *Animal Feed Science and Technology*, 68(3-4), 277-286.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577.
- Calder, P. C. (2006). n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1505S-1519S.
- Canter-Lund, H., & Lund, J. W. G. (1995). *Freshwater algae: their microscopic world explored*. Biopress Limited.
- Carrillo, S., López, E., Casas, M., Avila, E., Castillo, R., Carranco, M., Calvo, C. & Perez-Gil, F. (2008). *Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs*. Paper presented at the 19th International Seaweed Symposium.
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., & Chang, J.-S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10.
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D.-J & Chang, J.-S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource technology*, 229, 53-62.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126-131.

- Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 794-799.
- Chu, W.-L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *leJSME*, 6(1), S24-S37.
- Colla, L. M., Muccillo-Baisch, A. L., & Costa, J. A. V. (2008). Spirulina platensis effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(2), 405-411.
- Colomer, R., Moreno-Nogueira, J. M., García-Luna, P. P., García-Peris, P., García-de-Lorenzo, A., Zarazaga, A., Quecedo, L., del Llano, J., Usán, L. & Casimiro, C. (2007). n-3 Fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *British Journal of Nutrition*, 97(5), 823-831.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
- da Silva, G., de Jesus, E. F., Takiya, C., Del Valle, T., da Silva, T., Vendramini, T., Esther, J., Y., & Rennó, F. (2016). Partial replacement of ground corn with algae meal in a dairy cow diet: Milk yield and composition, nutrient digestibility, and metabolic profile. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8880-8884.
- Das, P., Thaher, M. I., Hakim, M. A. Q. M. A., Al-Jabri, H. M. S., & Alghasal, G. S. H. (2016). A comparative study of the growth of *Tetraselmis* sp. in large scale fixed depth and decreasing depth raceway ponds. *Bioresource Technology*, 216, 114-120.
- de Jesus Raposo, M. F., & de Moraes, A. M. M. B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences*, 125, 32-41.
- de la Fuente-Vazquez, J., Díaz-Díaz-Chirón, M. T., Pérez-Marcos, C., Cañeque, V., Sánchez-González, C. I., Alvarez-Acero, I., Fernández-Bermejo, C., Rivas-Cañedo, A., & Lauzurica, S. (2014). Linseed, microalgae or fish oil dietary supplementation affects performance and quality characteristics of light lambs. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(2), 436-447.
- Delgado, C. (2005). Rising demand for meat and milk in developing countries: implications for grasslands-based livestock production. *Grassland: a global resource*, 29-39.
- Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33(1), 1-18.

- Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy conversion and management*, 51(12), 2738-2749.
- Díaz, M., Pérez, C., Sánchez, C., Lauzurica, S., Cañeque, V., González, C., & De La Fuente, J. (2017). Feeding microalgae increases omega 3 fatty acids of fat deposits and muscles in light lambs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 115-123.
- Dong, H.-P., Williams, E., Wang, D.-z., Xie, Z.-X., Hsia, R.-c., Jenck, A., Halden, R., Chen, F., & Place, A. (2013). Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiology*, pp. 113.214320.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88(10), 3331-3335.
- Drewery, M., Sawyer, J., Pinchak, W., & Wickersham, T. (2014). Effect of increasing amounts of postextraction algal residue on straw utilization in steers. *Journal of Animal Science*, 92(10), 4642-4649.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2009). How to Feed the World in 2050. Rome: FAO.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2017). The Future of Food and Agriculture. Trends and Challenges. Rome: FAO.
- FAOSTAT (2015). Food and Agriculture Organization of the United States, Statistics Division. Disponível em: <http://faostat3.fao.org>. Acedido a 26/10/2018.
- Franklin, S. T., Martin, K. R., Baer, R. J., Schingoethe, D. J., & Hippen, A. R. (1999). Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *The Journal of Nutrition*, 129(11), 2048-2054.
- Friggens, N., Oldham, J., Dewhurst, R., & Horgan, G. (1998). Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1331-1344.
- Furbeyre, H., Van Milgen, J., Mener, T., Gloaguen, M., & Labussière, E. (2017). Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. *animal*, 11(2), 183-192.
- Gifuni, I., Olivieri, G., Pollio, A., & Marzocchella, A. (2018). Identification of an industrial microalgal strain for starch production in biorefinery context: The effect of nitrogen and carbon concentration on starch accumulation. *New Biotechnology*, 41, 46-54.

- Goering, H., & Van Soest, P. (1970). Forage fiber analysis. USDA Agricultural Research Service. Handbook number 379. *US Department of Agriculture, Washington, DC.*
- Goulas, C. (2000). *The effect of dietary fat on sheep diet digestibility and on lactating ewes performance*. Ph. D. Thesis. Agricultural University of Athens, Greece.
- Gouveia, L., Choubert, G., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., & Gomes, E. (2002). Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquaculture Research*, 33(12), 987-993.
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 269-274.
- Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O., & Empis, J. (2003). Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. *Aquaculture nutrition*, 9(2), 123-129.
- Graham, L. E., Graham, J. M., & Wilcox, L. W. (2009). *Algae*: Benjamin Cummings.
- Grammes, F., Revecó, F. E., Romarheim, O. H., Landsverk, T., Mydland, L. T., & Øverland, M. (2013). *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PloS one*, 8(12), e83213.
- Grigorova, S., Surdjiiska, S., Banskalieva, V., & Dimitrov, G. (2006). The effect of biomass from green algae of *Chlorella* genus on the biochemical characteristics of table eggs. *Journal of Central European Agriculture*, 7(1), 111-116.
- Grinstead, G., Tokach, M., Dritz, S., Goodband, R., & Nelssen, J. (2000). Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 83(3-4), 237-247.
- Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L., & Chamorro-Cevallos, G. (2015). Aspectos nutricionales y toxicológicos de *Spirulina* (*Arthrospira*). *Nutricion hospitalaria*, 32(1), 34-40.
- Halle, I., Janczyk, P., Freyer, G., & Souffrant, W. (2009). Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance. *Archiva Zootechnica*, 12(2), 5-13.
- Hasan, M. R., & Rina, C. (2009). *Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Hu, Q. (2004). *Environmental effects on cell composition* (Vol. 1): Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK.

- Hu, Q., Xiang, W., Dai, S., Li, T., Yang, F., Jia, Q., Wang, G., & Wu, H. (2015). The influence of cultivation period on growth and biodiesel properties of microalga *Nannochloropsis gaditana* 1049. *Bioresource Technology*, 192, 157-164.
- Janczyk, P., Wolf, C., & Souffrant, W. B. (2005). Evaluation of nutritional value and safety of the green microalgae *Chlorella vulgaris* treated with novel processing methods. *Archives de Zootechnie*, 8, 132-147.
- Jenkins, T., Wallace, R., Moate, P., & Mosley, E. (2008). BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86(2), 397-412.
- Kang, H., Salim, H., Akter, N., Kim, D., Kim, J., Bang, H., Kim, M. J., Na, J. C., Hwangbo, J., & Choi, H. (2013). Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(1), 100-108.
- Kholif, A., Morsy, T., Matloup, O., Anele, U., Mohamed, A., & El-Sayed, A. (2017). Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. *The Journal of Agricultural Science*, 155(3), 508-518.
- Kotrbaček, V., Doubek, J., & Doucha, J. (2015). The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: A review. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2173-2180.
- Kovač, D. J., Simeunović, J. B., Babić, O. B., Mišan, A. Č., & Milovanović, I. L. (2013). Algae in food and feed. *Food and Feed Research*, 40(1), 21-31.
- Kulpys, J., Paulauskas, E., Pilipavicius, V., & Stankevicius, R. (2009). Influence of cyanobacteria *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass additive towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agronomy Research*, 7, 823-835.
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource technology*, 167, 358-366.
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Simpura, I., Jaakkola, S., & Vanhatalo, A. (2017). Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 234, 295-311.

- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 935-945.
- Lipstein, B., & Talpaz, H. (1984). Sewage-grown algae as a source of pigments for broilers. *British Poultry Science*, 25(2), 159-165.
- López, S., & Newbold, C. (2007). Analysis of methane. In *Measuring methane production from ruminants* (pp. 1-13): Springer.
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., Lavín, P. L., Lanfer Marquez, U. M., & Aidar, E. (2004). Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology*, 39(1), 17-32.
- Lum, K. K., Kim, J., & Lei, X. G. (2013). Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 53.
- Machů, L., Mišurcová, L., Samek, D., Hrabě, J., & Fišera, M. (2014). *In vitro* digestibility of different commercial edible algae products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23(5), 423-435.
- Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., & Prates, J. A. (2017). Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, 205, 111-121.
- Mahboob, S., Rauf, A., Ashraf, M., Sultana, T., Sultana, S., Jabeen, F., Rajoka, M. I., Al-Balawi, H. F. A., & Al-Ghanim, K. A. (2012). High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. *Aquaculture International*, 20(3), 455-466.
- Maia, M. R., Fonseca, A. J., Oliveira, H. M., Mendonça, C., & Cabrita, A. R. (2016). The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production. *Scientific Reports*, 6, 32321.
- Marriott, N., Garrett, J., Sims, M., & Abril, J. (2002). Performance characteristics and fatty acid composition of pigs fed a diet with docosahexaenoic acid. *Journal of Muscle Foods*, 13(4), 265-277.
- Mišurcová, L., Kráčmar, S., Klejdus, B., & Vacek, J. (2010). Nitrogen content, dietary fiber, and digestibility in algal food products. *Czech Journal of Food Sciences*.
- Moate, P., Williams, S., Hannah, M., Eckard, R., Auldist, M., Ribaux, B., Jacobs, J. L., & Wales, W. (2013). Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on

- feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 3177-3188.
- Moheimani, N. R., Vadiveloo, A., Ayre, J. M., & Pluske, J. R. (2018). Nutritional profile and *in vitro* digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent. *Algal Research*, 35, 362-369.
- Monks, L., Rigo, A., Mazutti, M., Oliveira, J. V., & Valduga, E. (2013). Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(2), 165-169.
- Moore, K. J., & Jung, H.-J. G. (2001). Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management*, 420-430.
- Mordenti, A., Sardi, L., Bonaldo, A., Pizzamiglio, V., Brogna, N., Cipollini, I., Tassinari, M., & Zaghini, G. (2010). Influence of marine algae (*Schizochytrium* spp.) dietary supplementation on doe performance and progeny meat quality. *Livestock Science*, 128(1-3), 179-184.
- Morgavi, D., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *animal*, 4(7), 1024-1036.
- Mould, F., Morgan, R., Kliem, K., & Krystallidou, E. (2005). A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 155-172.
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., de Carvalho, G. C., Nascimento, M. A., de Souza, C. O., Druzian, J. I., Hussain, J., & Liao, W. (2014). Microalgae versus land crops as feedstock for biodiesel: productivity, quality, and standard compliance. *Bioenergy Research*, 7(3), 1002-1013.
- Novriadi, R., & Proano, G. (2018). Effects of different light intensities and nutrient source on growth rate and crude fat content in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 9(6). doi:10.4172/2155-9546.1000539
- Oh, S. T., Zheng, L., Kwon, H., Choo, Y., Lee, K., Kang, C., & An, B.-K. (2015). Effects of dietary fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(1), 95.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., Aremu, A. O., Okem, A., Lovász, C., Molnár, Z., & van Staden, J. (2016). Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains. *Algal Research*, 16, 141-149.

- Papadopoulos, G., Goulas, C., Apostolaki, E., & Abril, R. (2002). Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, 69(3), 357-365.
- Park, K. R., Park, C. S., & Kim, B. G. (2016). An enzyme complex increases *in vitro* dry matter digestibility of corn and wheat in pigs. *Springerplus*, 5(1), 598.
- Peiretti, P., & Meineri, G. (2008). Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. *Livestock Science*, 118(1-2), 173-177.
- Peiretti, P., & Meineri, G. (2009). Effects of two antioxidants on the morpho-biometrical parameters, apparent digestibility and meat composition in rabbits fed low and high fat diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 2299-2304.
- Póti, P., Pajor, F., Bodnár, Á., Penksza, K., & Köles, P. (2015). Effect of micro-alga supplementation on goat and cow milk fatty acid composition. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75(2), 259-263.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89-100.
- Reboloso-Fuentes, M. M., Navarro-Pérez, A., Garcia-Camacho, F., Ramos-Miras, J., & Guil-Guerrero, J. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2966-2972.
- Reynolds, C., Cannon, V., & Loerch, S. (2006). Effects of forage source and supplementation with soybean and marine algal oil on milk fatty acid composition of ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4), 333-357.
- Ribeiro, T., Lordelo, M. M., Costa, P., Alves, S. P., Benevides, W. S. , Bessa, R. J. B., Lemos, J. P. C, Pinto, R. M. A., Ferreira, L. M. A., & Fontes, C. M. G. A, (2014). Effect of reduced dietary protein and supplementation with a docosaheptaenoic acid product on broiler performance and meat quality. *British Poultry Science*, 55(6), 752-765.
- Richmond, A., & Hu, Q. (2013). *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. John Wiley & Sons.
- Robertson, J. B., & Van Soest, P. J. (1981). The analysis of dietary fiber in food. In W. P. T. James & O. Teander (Eds.), *The Analysis of Dietary Fiber in Food* (pp. 123-158). New York: Marcel Dekker Inc.
- Ross, L. G. (2001). *Prawns of Japan and the World*. CRC Press.

- Salomonsson, A. C., Theander, O., & Westerlund, E. (1984). Chemical characterization of some Swedish cereal whole meal and bran fractions. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 14(3), 111-117.
- Sardi, L., Martelli, G., Lambertini, L., Parisini, P., & Mordenti, A. (2006). Effects of a dietary supplement of DHA-rich marine algae on Italian heavy pig production parameters. *Livestock Science*, 103(1-2), 95-103.
- Sarker, P., Gamble, M., Kelson, S., & Kapuscinski, A. (2016a). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquaculture Nutrition*, 22(1), 109-119.
- Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Lanois, A. J., Livesey, E. D., Bernhard, K. P., & Coley, M. L. (2016b). Towards sustainable aquafeeds: complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PloS one*, 11(6), e0156684.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 102(19), 9121-9127.
- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Khoeyi, Z. A. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 23(4), 721-726.
- Song, B., Marchant, M. A., Reed, M. R., & Xu, S. (2009). Competitive analysis and market power of China's soybean import market. *International Food and Agribusiness Management Review*, 12(1), 21-42.
- Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in novel food products. *Food Chemistry Research Developments*, 75-112.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Stamey, J., Shepherd, D., De Veth, M., & Corl, B. (2012). Use of algae or algal oil rich in n-3 fatty acids as a feed supplement for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5269-5275.

- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., Rosales, M., & de Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options*. Rome: FAO.
- Stokes, R., Van Emon, M., Loy, D., & Hansen, S. (2015). Assessment of algae meal as a ruminant feedstuff: Nutrient digestibility in sheep as a model species. *Journal of Animal Science*, 93(11), 5386-5394.
- Tassinari, M., Mordenti, A., Testi, S., & Zotti, A. (2001). Esperienze sulla possibilità di arricchire con la dieta la carne di coniglio di LCPUFA n-3. *Progress in Nutrition*, 3, 71-71.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3-4), 185-197.
- Thornton, P. K. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853-2867.
- Tibaldi, E., Zittelli, G. C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M. R., & Poli, B. (2015). Growth performance and quality traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp.(T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, 440, 60-68.
- Tibbetts, S. M., Whitney, C. G., MacPherson, M. J., Bhatti, S., Banskota, A. H., Stefanova, R., & McGinn, P. J. (2015). Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. *Algal Research*, 11, 435-447.
- Tilley, J., & Terry, R. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, 18(2), 104-111.
- Tokuşoglu, Ö., & Ünal, M. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, 68(4), 1144-1148.
- Toral, P. G., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez, M., & de La Fuente, M. (2010). Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1655-1667.

- Tsiplakou, E., Abdullah, M., Mavrommatis, A., Chatzikonstantinou, M., Skliros, D., Sotirakoglou, K., Fletmetakis, E., Labrou, N. E., & Zervas, G. (2018). The effect of dietary *Chlorella vulgaris* inclusion on goat's milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1), 142-151.
- Tsiplakou, E., Abdullah, M. A., Alexandros, M., Chatzikonstantinou, M., Skliros, D., Sotirakoglou, K., Fletmetakis, E., Labrou, N. E., & Zervas, G. (2017). The effect of dietary *Chlorella pyrenoidosa* inclusion on goats milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation. *Livestock Science*, 197, 106-111.
- United Nations, (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. United Nations.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
- Volkman, J. K., & Brown, M. R. (2006). Nutritional value of microalgae and applications. *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications, Volume 1*, 407-457.
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A.G., Camire, M. E., & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied phycology*, 29(2), 949-982.
- Wild, K. J., Steingäß, H., & Rodehutsord, M. (2018a). Variability in nutrient composition and *in vitro* crude protein digestibility of 16 microalgae products. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(5), 1306-1319.
- Wild, K. J., Steingäß, H., & Rodehutsord, M. (2018b). Variability of *in vitro* ruminal fermentation and nutritional value of cell-disrupted and nondisrupted microalgae for ruminants. *GCB Bioenergy*.
- Xu, W., Gao, Z., Qi, Z., Qiu, M., Peng, J.-q., & Shao, R. (2014). Effect of dietary *Chlorella* on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1).
- Yan, L., Lim, S., & Kim, I. (2012). Effect of fermented *Chlorella* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbial and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(12), 1742.

- Yáñez-Ruiz, D. R., Bannink, A., Dijkstra, J., Kebreab, E., Morgavi, D. P., O’Kiely, P., Reynolds, C. K., Schwarm, A., Shingfield, K. J., & Yu, Z. (2016). Design, implementation and interpretation of *in vitro batch* culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants—a review. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 1-18.
- Yao, C., Ai, J., Cao, X., Xue, S., & Zhang, W. (2012). Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource technology*, 118, 438-444.
- Yoshida, M., & Hoshii, H. (1982). Nutritive value of new type of *Chlorella* for poultry feed. *Japanese Poultry Science*, 19(1), 56-59.
- Zahran, E., & Risha, E. (2014). Modulatory role of dietary *Chlorella vulgaris* powder against arsenic-induced immunotoxicity and oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 654-662.

